



Etude du rôle du récepteur aux hydrocarbures aromatiques ou AhR dans le développement et l'homéostasie du système nerveux de la souris C57BL/6J

Aline Chevallier

► To cite this version:

Aline Chevallier. Etude du rôle du récepteur aux hydrocarbures aromatiques ou AhR dans le développement et l'homéostasie du système nerveux de la souris C57BL/6J. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05P638 . tel-00911886

HAL Id: tel-00911886

<https://theses.hal.science/tel-00911886>

Submitted on 1 Dec 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNÉE 2012

N°

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Spécialité : NeuroToxicologie

Ecole doctorale Médicament Toxicologie Chimie Environnement

Aline Chevallier

**Etude du rôle du récepteur aux hydrocarbures aromatiques ou AhR dans le
développement et l'homéostasie du système nerveux de la souris C57BL/6J**

Soutenue la 30 novembre 2012

Laboratoire « Toxicologie, Pharmacologie et signalisation cellulaire »

INSERM UMR-S 747

JURY

Dr Alain CHEDOTAL

Rapporteur

Dr Olivier KAH

Rapporteur

Pr Charbel MASSAAD

Examineur

Dr Xavier DECLEVES

Examineur

Dr Mathieu BERANECK

Examineur

Dr Armelle BAEZA-SQUIBAN

Examineur

Pr Xavier COUMOUL

Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaiterais, tout d'abord, remercier les membres du jury pour avoir accepté de participer et d'évaluer mes travaux de thèse. Merci au Dr Alain Chédotal pour ses conseils techniques et son travail de rapporteur. Merci au Dr. Olivier Kah d'avoir accepté d'évaluer ma thèse. J'aimerais également remercier mes examinateurs, le Pr. Charbel Massaad et le Dr Xavier Declèves, j'espère que ce sujet vous passionnera autant qu'il m'a passionnée tout au long de mes années de thèse.

Je remercie le Dr Mathieu Beraneck d'avoir accepté d'être mon examinateur et pour son soutien. Tu m'as énormément appris depuis le début de notre collaboration, de la découverte du système vestibulaire à la vidéo-oculographie en passant par l'open field et l'utilisation de Matlab et de CorelDraw.

Je remercie «chef» le Pr Xavier Coumoul, qui a accepté d'être mon directeur de thèse. Je te dois mes premiers pas dans le monde de la recherche. Tu m'as transmis cette passion ainsi que celle de l'enseignement. Ton soutien dans les moments les plus durs m'était très précieux. Je n'oublierai jamais tous ces bons moments aux restaurants, pour les anniversaires et nos discussions animées autour du métal et des jeux vidéo !

Merci au Pr Robert Barouki de m'avoir accueillie dans son laboratoire dès ma dernière année de licence, pour ses conseils techniques et les réunions du mardi. Merci de m'avoir soutenue jusqu'à la fin de ma thèse (qui a duré un peu plus longtemps que prévue) et d'avoir eu confiance en mon projet pendant toutes ces années.

Durant ces 5 ans passés au laboratoire, j'ai rencontré de nombreuses personnes qui m'ont aidée et soutenue. Je pense notamment au Dr Martine Aggerbeck à ces bons moments passés à Paris et à Barcelone et à ta disponibilité lorsque mon chef n'était pas là ; au Dr Céline Tomkiewicz pour tes conseils techniques très précieux ; au Dr Etienne Blanc, qui malgré son déménagement dans le bureau voisin, est toujours d'une grande aide surtout pour déceler mes erreurs de manip ; à Béatrice Legrand, notre technicienne adorée, pour tous tes petits « post-it » collés et à ta bonne humeur ; au Dr Lon Aggerbeck, notre interprète et expert en puce à ADN, merci pour tes conseils en anglais et tes corrections si précieuses ; au Dr

Jean-François Chassé, mon directeur de thèse provisoire et à Chris pour ton aide dans l'analyse et la compréhension des puces à ADN.

Je tiens également à remercier toutes les personnes de mon équipe d'adoption lors de mon M2 et d'une partie de ma thèse, je veux bien sûr parler de l'équipe 5. Merci au Dr Benoit Schneider de m'avoir co-encadrée lors de mon M2 même si le projet n'ait pas abouti à une publication, au Pr Odile Kellermann de m'avoir permis d'utiliser son modèle cellulaire, au Dr Sophie Mouillet-Richard pour tous ses petits mots d'encouragements pendant ce parcours.

Merci au Dr Christiane Garbay pour son soutien pour la prolongation de ma thèse.

Merci à tous les membres de l'Institut de la vision et notamment à Francesco pour son aide en hybridation *in situ*.

Merci :

- A l'ensemble des membres de l'Inserm UMR-S 747 pour tous ces moments sérieux ou moins passés à vos côtés.
- A Stéphane mon « maître yoda », Ariane, Linh et Erwan, le quatuor de mes premières années de laboratoire, pour nos déjeuners animés au resto U, les moments au Frog et tout simplement pour ces nombreux fous rires partagés avec vous. Le laboratoire n'était pas le même sans vous. Merci à Alix la hollandaise et Ludmila « ma padawan » qui me supporte au quotidien dans le bureau, Oui Fm n'aura plus de secret pour vous, à Clémentine pour ton rire et ta bonne humeur et à Nono l'exploratrice. J'espère que vous avez bien révisé votre chorégraphie.
- A Sacha pour sa gentillesse et son écoute, à Joolia, Séverine, Théo et Hector, toujours les derniers à partir des bars avec moi, à tous les étudiants passés et futurs de l'U747, Min-ji, Damien, Elodie, Emilie, Yassine, Emmanuel, Tutu, Elissar, Alex, Carole, Caroline et à tous les stagiaires du laboratoire.
- Aux membres de l'unité « ennemie » et surtout spéciale dédicace à Karine pour nos longues discussions et nos déjeuners dans les parcs et pour ta bonne humeur de tous les jours.
- A Jean-Maurice pour ses conseils sur la microscopie et les chocolats et autres sucreries.
- A l'équipe des neuro, Julien B. pour tes sms le dimanche matin « au taf la thésarde ! », c'est quand tu veux pour prendre ta revanche à Mario Kart, à Marielle et Delphine pour nos sorties dans les bars, à GG pour nos galères de Grip test, à Martin pour ton

soutien et ton écoute, à Julien G pour ces moments de rigolade pendant les TP de biochimie, et à Medhi bienvenue en thèse !

- A Vasco merci de me changer les idées le midi.
- A Erwin dont le proverbe préféré est : « un problème, un Erwin, une solution ! », à Marie pour l'apprentissage des points de suture « sans les mains », à Lindell pour tes conseils techniques pour le rotarod et les immuno-histochimies, à Lionel pour l'utilisation d'éthomice et de Matlab.
- A Antoine, pour tes cours sur l'évolution et les neurosciences, pour les goûters partagés, pour m'avoir appris à attraper Dodu et les autres (et à les tuer aussi ...), merci pour ton soutien dans les coups durs et tous ces bons moments passés ensemble.

Je tiens également à remercier mes amis qui m'ont toujours soutenue et m'ont aidée à me changer les idées : à Adeline de m'accueillir chez toi, les pique-niques, et pour nos nombreux coups de fils, à Alex, Riri, Vincent C, Vincent O, Stéphanie, Laurent, Christophe, Angela, Jean-François, Gaëlle et Magalie, à Bichon et Sandra mes amis de licence pour ces bons repas et nos séjours aux ski et à Amsterdam, à Jennifer qui me supporte depuis le collège, à Romain pour nos discussions devant des bières, à Soraya et à Jérémie, mes amis de P1 et à Benoit pour ton soutien et ton aide.

Un dernier remerciement pour ma famille, à mon papa, à ma maman qui m'a soutenue au quotidien, à mon grand frère et Alina pour tous ces bons moments passés et promis, je ne ramène plus rien à la maison !

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	7
Table des illustrations	9
Liste des abréviations et acronymes	11
Préambule	15
Introduction	16
I. Le AhR	16
A. Historique :	16
B. Le AhR chez les vertébrés	19
1. Structure	19
a) Le domaine bHLH (basic Helix Loop Helix)	19
b) Le domaine PAS	20
c) Le domaine de transactivation	21
2. Polymorphismes du AhR murin	22
3. Phylogénie	23
4. Expression et régulation de l'expression du AhR	25
5. Voie de signalisation du AhR	26
a) Le complexe cytoplasmique du AhR	26
b) Le complexe nucléaire du AhR : Interaction avec ARNT	29
c) Voie d'activation du AhR ligand-dépendante	29
(1) Les ligands exogènes	32
(2) Les ligands endogènes	34
(3) Les sAhRMs (« selective AhR Modulators »)	35
d) Voies de signalisation indépendantes de la liaison à un ligand	36
6. Régulation de la protéine AhR	37
a) Dégradation dépendante du protéasome	37
b) AhRR	37
7. Modèles de souris transgéniques	39
8. Rôles physiologiques émergents du AhR	42
a) Rôle dans le système immunitaire	42
b) Rôle dans l'inflammation	43
c) Rôle dans la migration	44
d) Rôle anti-œstrogénique/pro-œstrogénique	45
C. Le AhR chez les invertébrés	46
1. <i>Caenorhabditis elegans</i>	46
2. <i>Drosophila melanogaster</i>	48
II. Le AhR et le système nerveux des mammifères	53
A. Localisation du AhR dans le système nerveux	53
B. Rôles du AhR dans le système nerveux des mammifères : Effets d'un ligand exogène : la TCDD	56
1. Etudes comportementales	56
2. Etudes des mécanismes neurotoxiques de la TCDD	57
a) Action sur les oligodendrocytes	57
b) Action sur les astrocytes	58
c) Action sur les neurones	58
(1) Effets toxiques sur les précurseurs neuronaux	58
(2) Effets toxiques sur les neurones différenciés	62
(3) Effets sur la sécrétion de neurotransmetteurs	64
3. Effets neurotoxiques de la TCDD sur le système nerveux périphérique	65

4. Neurotoxicité indirecte de la dioxine.....	65
a) Effets de la TCDD sur le système thyroïdien.....	65
b) Effets de la TCDD sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique	66
C. Rôle endogène du AhR dans le système nerveux central	67
D. Hypothèse de travail	69
III. Objectifs de la thèse.....	71
Résultats.....	75
IV. Déficiences oculomoteurs chez les souris déficientes pour le AhR.....	75
A. Contexte scientifique	75
1. Les systèmes de stabilisation du regard.....	78
a) Le réflexe vestibulo-oculaire.....	79
(1) Les organes vestibulaires de l'oreille interne	80
(2) Les noyaux vestibulaires centraux	82
(3) Le réflexe vestibulo-oculaire angulaire horizontal.....	83
(4) L'adaptation du VOR horizontal.....	85
b) Le réflexe optocinétique	86
(1) Les différentes voies rétino-fuges.....	87
(2) Réseaux neuronaux impliqués dans le réflexe optocinétique.....	88
B. Buts de l'étude	90
C. Résumé en français	91
Conclusion	93
V. Perturbation endogène des fonctions du AhR dans le cervelet de souris C57BL/6 par la dioxine.....	101
A. Contexte scientifique	101
B. Buts de l'étude	102
C. Résumé en français	104
D. Conclusion	106
VI. Les voies de signalisation du AhR : implications pharmacologiques et toxicologiques	110
VII. Le récepteur de la dioxine : rôle endogène et médiateur de la toxicité de la dioxine...	115
Articles annexes.....	117
VIII. Induction d'une fibrose hépatique dépendante du AhR chez les souris traitées par la dioxine	119
A. Contexte scientifique	119
B. Buts de l'étude	121
C. Résumé en français	121
D. Conclusion	124
IX. Implication du AhR dans les processus de migration et de prolifération cellulaire.....	128
Conclusion et discussion générale	130
Bibliographie	140

Table des illustrations

FIGURE 1: SCHEMA SIMPLIFIE DU METABOLISME DES XENOBIOTIQUES.	17
FIGURE 2: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS DOMAINES DU RECEPTEUR AHR MURIN (C57BL/6) ET DE LEURS FONCTIONS RESPECTIVES.	19
FIGURE 3: STRUCTURE DES MEMBRES FONDATEURS DE LA FAMILLE PAS : PER, ARNT ET SIM.	20
FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU AHR MURIN ET DE SES POLYMORPHISMES.	23
FIGURE 5: ARBRE PHYLOGENETIQUE DU RECEPTEUR AHR.	24
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU COMPLEXE CYTOPLASMIQUE DU AHR.	26
FIGURE 7: VOIE DE TRANSDUCTION DU AHR.	30
TABEAU 1: SEQUENCE DE DIFFERENTS XRE RECONNUS PAR LE AHR.	31
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS SITES DE PHOSPHORYLATION DU AHR MURIN.	32
FIGURE 9 : EXEMPLES DE LIGANDS EXOGENES DU AHR.	33
FIGURE 10 : EXEMPLES DE LIGANDS ENDOGENES DU AHR.	34
FIGURE 11: STRUCTURES DE 2 SAHRM : LE 6-METHYL-1,3,8-TRICHLORODIBENZOFURANE (6-MCDF) ET LE DIINDOLYMETHANE (DIM).	35
FIGURE 12: REPRESENTATION PAR DOMAINES DU AHRM ET DU AHR MURIN.	38
FIGURE 13: MECANISMES DE REPRESSION DE LA PROTEINE DU AHR PAR LE AHRM.	39
TABEAU 2 : PHENOTYPES OBSERVES CHEZ LES DIFFERENTES SOUCHES DE SOURIS AHR ^{-/-}	41
FIGURE 14 : EFFET DE DIFFERENTS LIGANDS DU AHR SUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES Th0, PRECURSEUR DES LYMPHOCYTES T « HELPER ».	43
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SYSTEME GABAERGIQUE DU NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS.	47
FIGURE 16: STRUCTURE DU AHR MURIN ET DE SPINELESS.	48
FIGURE 17 : EXEMPLES DE PHENOTYPES OBSERVES CHEZ LES MUTANTS SPINELESS.	49
FIGURE 18: CARTOGRAPHIE ET PHENOTYPE ASSOCIE DES PHOTORECEPTEURS DES OMMATIDIES CHEZ LES DIFFERENTS MUTANTS SPINELESS.	50
FIGURE 19: ARBORISATION DENDRITIQUE DE 2 TYPES DE NEURONES SENSORIELS CHEZ DES DROSOPHILES SAUVAGES ET MUTANTES SPINELESS.	51
FIGURE 20 : LOCALISATION DE L'ARNM DU AHR DURANT LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CHEZ LA SOURIS.	54
FIGURE 21 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES POPULATIONS CELLULAIRES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL.	57
FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DEVELOPPEMENT DU CERVELET.	60
FIGURE 23 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES DE NEUROTOXICITE DE LA TCDD DEPENDANT DU CALCIUM.	63
FIGURE 24 : CONSTITUANTS CELLULAIRES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE.	66
FIGURE 24 : EFFET DE L'INVALIDATION DU AHR SUR LA SIGNALISATION DES RECEPTEURS NMDA.	68
FIGURE 25 : IMAGE EN CONTRASTE DE PHASE DES NEUROFILAMENTS PHOSPHORYLES NF-H DANS LES CELLULES NEURO2A SUREXPRIMANT OU NON LE AHR.	69
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INSERTION DES 3 PAIRES DE MUSCLES EXTRA-OCULAIRES SUR L'ŒIL DROIT.	76
FIGURE 27 : REPRESENTATION SIMPLIFIEE DU CERVEAU DE SOURIS (COUPE SAGITTALE).	77
FIGURE 28 : LE SYSTEME VESTIBULAIRE.	80
FIGURE 29 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU FONCTIONNEMENT DES CELLULES CILIEES DE L'OREILLE INTERNE.	81
FIGURE 30 : LOCALISATION (A) ET AFFERENCES (B) DES NOYAUX VESTIBULAIRES DU TRONC CEREBRAL.	82
FIGURE 31 : LE REFLEXE VESTIBULO-OCULAIRE HORIZONTAL.	83
FIGURE 32 : RESEAUX NEURONAUX IMPLIQUES DANS LE CONFLIT VISUO-VESTIBULAIRE.	86
FIGURE 33 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SYSTEME VISUEL CHEZ LA SOURIS.	87
FIGURE 34 : REPRESENTATION SIMPLIFIEE DES RESEAUX IMPLIQUES DANS LE REFLEXE OPTOCINETIQUE.	89
FIGURE 35 : STIMULATEUR VESTIBULAIRE.	90
FIGURE 36 : HYBRIDATION <i>IN SITU</i> MONTRANT LA LOCALISATION DU AHR DANS LES EMBRYONS DE SOURIS C57BL/6J DE 12 JOURS.	94
FIGURE 37 : TEST DE L'OPENFIELD.	95
FIGURE 38 : TEST DU ROTAROD.	96
FIGURE 39 : ILLUSTRATION DE L'HYPOTHESE DE LA PERTURBATION ENDOGENE.	102
FIGURE 40 : DESSIN EXPERIMENTAL DE L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE.	103
FIGURE 41 : HISTOLOGIE DU FOIE D'UNE SOURIS AHR ^{+/+} (A GAUCHE) ET D'UNE SOURIS AHR ^{-/-} (A DROITE).	119

FIGURE 42 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DE FIBROSE HEPATIQUE.	120
FIGURE 43 : ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPAUX TYPES CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES DE SCHWANN	132
FIGURE 44 : LES DIFFERENTES VOIES D'ACTIVATION DU AHR ET LES REPONSES TRANSCRIPTIONNELLES ASSOCIEES.	134

Liste des abréviations et acronymes

α NF : alpha NaphtoFlavone

α SMA : « alpha-SMooth Actin »

AhR : « Aryl hydrocarbonReceptor »

ahr-1 : « aryl hydrocarbon receptor related 1 »

AhRR : « Aryl hydrocarbon Receptor Repressor »

AIP : « AhR Interacting Protein »

AIPL1 : « AhR Interacting Protein Like-1 »

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

AOS : « Accessory optic system »

AP-1 : « activating protein 1 »

Ara9 : « AhR associated protein 9 »

ARNT : « AhR Nuclear Translocator »

BaP : Benzo(a)pyrène

BAX : « Bcl-2-associated X protein »

BDNF : « Brain-Derived Neurotrophic Factor »

BG : « Bergmann cell »

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

bHLH : « basic Helix-Loop-Helix »

BRG-1 : « Brahma/SWI2-Related Gene 1 protein »

CaMK-IV : « Calcium/calmodulin dependant protein kinase IV »

CAR : « Constitutive Androstane Receptor »

CBP : « CREB Binding Protein »

CGL : Corps Genouillé Latéral

CREB : « cAMP-Responsive Element Binding protein »

Cyp1A1 : Cytochrome P450 1A1

dbAMPc : dibutyryl AMPc

EGL : « external Granular layer »

EMX : Enzyme du Métabolisme des Xénobiotiques »

ER α : « Estrogen Receptor α »

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

FICZ : 6-formylindolo[3,2-b]carbazole

FRMD7 : « FERM domain-containing protein 7 »

FTN : « Floccular Target Neuron »

GABA : « γ -AminoButyric Acid »

GAD : « Glutamic Acid Décarboxylase »

GFAP : « Glial Fibrillary Acidic Protein »

GNP : « Granular cell precursor »

HAH : Hydrocarbures Aromatiques Halogénés

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Hes1 : « Hairy and enhancer of split-1 »

HIF : « Hypoxia Inductible Factor »

Hsp90 : « Heat shock protein 90 »

IARC : « International Agency for Research on Cancer »

IGL : « Internal Granular Layer »

IO : « Inferior Olivary »

KN : « KynureniN »

KO : « Knock-Out »

NES : « Nuclear Export Signal »

NLS : « Nuclear Localization Signal »

NMDA : acide N-Méthyl-D-Aspartique

NOT : « Nucleus of Optic Tract »

NPC : « Neural Progenitor Cell »

NTD : Noyau Terminal Dorsal

NTL : Noyau Terminal Latéral

NTM : Noyau Terminal Médian

NVI : Noyaux Vestibulaires Inférieurs

NVL : Noyaux Vestibulaires Latéraux

NVM : Noyaux Vestibulaires Médians

NVS : Noyaux Vestibulaires Supérieurs

OKR : « OptoKinetic Reflex »

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAS : « PER-ARNT-SIM »

PAC : « PAS Associated C-terminal domain »

PCB : PolyChloro Biphenyles

PCDD : PolyChloroDibenzo-p-Dioxines

PCDF : PolyChloroDibenzo-p-Furanes

p/CIP : « p300/CBP cointegrator protein »

PER : « Period »

per os : voie orale

PKC : Protéine Kinase C

POP : « Persistent Organic Pollutant »

PSA-NCAM : « PolySialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecule »

PXR : « Pregnane X Receptor »

qPCR : « quantitative Polymerase Chain Reaction »

sAhRM : « selective AhR Modulators »

shRNA : « Short Harpin RNA »

SIM : « SIngle Minded »

siRNA : « small interfering RNA »

SMRT : « Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors »

SNC : Système Nerveux Central

SNP : « Single nucleotide polymorphism »

SOS1 : « Son Of Sevenless 1 »

Sp1 : « Stimulating protein 1 »

SRC : « Steroid Receptor Coactivator »

Ss : « Spineless »

TAD : « TransActivation Domain »

TCDD : 2,3,7,8 TetraChloroDibenzo-p-Dioxine

TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGFβ : « Transforming Growth Factor β »

TME : Transition Mésenchymo-Epithéliale

Th17 : Lymphocyte T « helper » 17

VEGF : « Vascular Endothelial Growth Factor »

VOR : « Vestibulo-Ocular Reflex »

XAP2 : « X-Associated Protein 2 »

XRE : « Xenobiotic Responsive Element »

ZEB2 : « zinc finger E-box Binding homeobox 2 »

Préambule

Les activités industrielles dans les pays développés ont entraîné une augmentation de la contamination des écosystèmes et des organismes par des polluants environnementaux. Ces pollutions croissantes sont à l'origine de nombreuses maladies comme le cancer et l'asthme ce qui pose un problème majeur de santé publique. De plus, des études épidémiologiques ont montré un lien entre les neuropathies (maladie de Parkinson, syndrome cholinergique...) et une exposition à certains polluants (pesticides ...). Parmi les polluants incriminés, une intoxication aiguë au paraquat, herbicide utilisé par les agriculteurs, entraîne, notamment, la mort des neurones dopaminergiques de la substance noire, conduisant à la maladie de Parkinson. D'autres pesticides et polluants favorisent l'augmentation de l'incidence de la maladie de Parkinson dont la roténone et les organochlorés. De plus, les organophosphorés (insecticides), ciblant l'acétylcholine estérase (AChE), provoquent l'apparition d'un syndrome cholinergique (se caractérisant successivement par des maux de tête, des vomissements, une confusion, une ataxie, un coma et un blocage de la respiration) lors d'une intoxication aiguë. Enfin, une exposition prénatale ou néonatale (et donc chronique à basse dose) à un organophosphoré encore utilisé (le chlorpyrifos) conduit à une altération des performances locomotrices (hyperactivité) et cognitives (mémoire, apprentissage) chez les jeunes enfants.

De nombreux polluants incriminés dans ces troubles neurotoxiques sont caractérisés par leur grande stabilité dans l'environnement et sont appelés POPs (polluants organiques persistants). Au cours de l'évolution, des systèmes de défense se sont mis en place pour reconnaître et éliminer ces substances toxiques de nos organismes. La première ligne de défense est la détection de ces molécules par l'intermédiaire de récepteurs intracellulaires dont le Aryl hydrocarbon Receptor (ou AhR).

Introduction

I. Le AhR

A. Historique :

Au cours de leur vie, les organismes vivants sont exposés quotidiennement à de multiples composés chimiques toxiques contenus dans l'air, l'eau ou bien la nourriture. Face à cette menace, les êtres vivants ont développé des systèmes de détection, de biotransformation et d'élimination des composés toxiques. Les enzymes qui participent à ces réactions sont bien caractérisées et incluent, par exemple, les monooxygénases et les transporteurs de la famille ABC (« ATP Binding Cassette »). Ces enzymes sont sous le contrôle de récepteurs solubles appelés « récepteurs des xénobiotiques » dont font partie le PXR (« Pregnane X Receptor »), le CAR (« Constitutive Androstane Receptor ») et le AhR (« Aryl hydrocarbon Receptor ») (Figure 1).

Le AhR a été découvert en 1976 par l'équipe du Dr D.W. Nebert qui évoque dans un article, l'existence d'un ensemble de gènes contrôlant l'induction d'enzymes à activité « aryl-hydroxylase » (Poland et al., 1976). Ce récepteur est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines bHLH/PAS (« basic-Helix-Loop-Helix/PER-ARNT-SIM »). Les acteurs de cette famille interviennent dans de nombreuses voies de signalisation comme par exemple la réponse aux polluants environnementaux (AhR), à l'hypoxie (HIF pour « Hypoxia Inducible Factor »), dans le rythme circadien (Per pour Period) et le développement neuronal (SIM pour « Single-Minded »). Plus précisément, le AhR appartient à la classe 1 de la famille bHLH/PAS. Cette classe inclut des facteurs qui ne peuvent ni s'hétérodimériser, ni s'homodimériser entre eux. Ainsi, ces protéines se complexent à des facteurs bHLH/PAS de classe 2 comme l'ARNT (« Aryl hydrocarbon receptor Nuclear Translocator ») (Kim *et al.*, 2004). Les acteurs de la voie de signalisation du AhR furent identifiés dans les années 90 avec le clonage du récepteur et de son partenaire (ARNT) (Burbach *et al.*, 1992, Hoffman *et al.*, 1991). Traditionnellement, la principale fonction du AhR décrite dans la littérature est la régulation de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) (Figure 1).

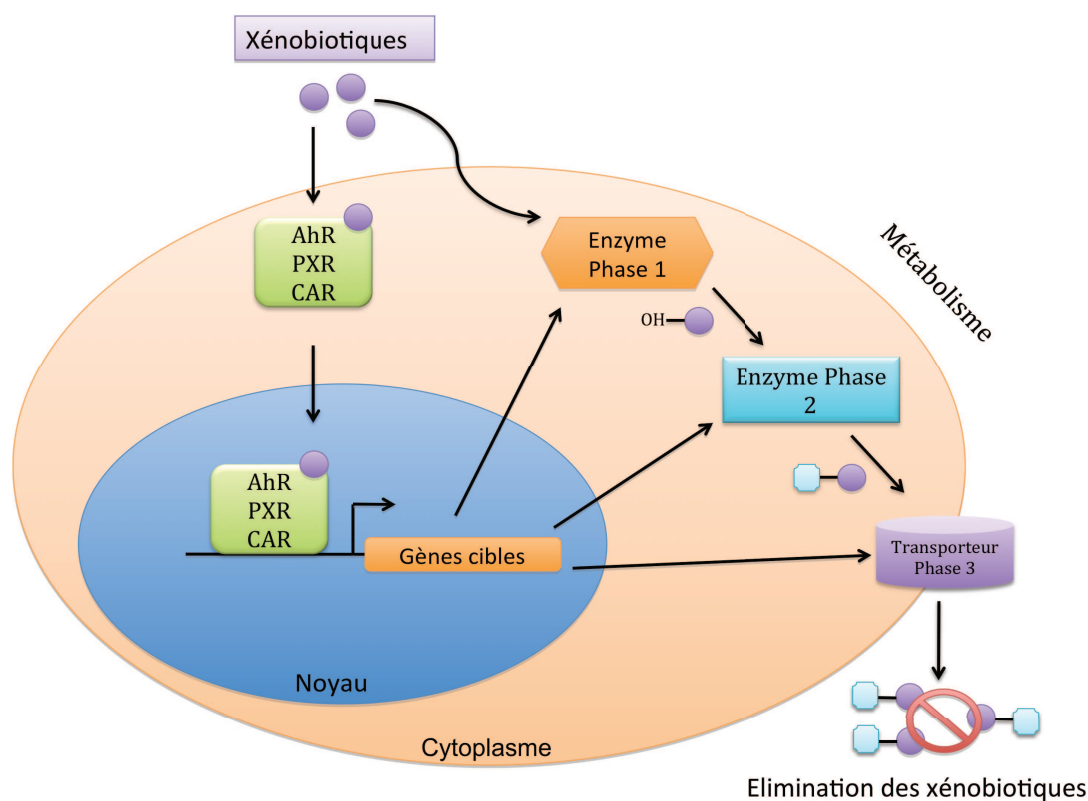


Figure 1: Schéma simplifié du métabolisme des xénobiotiques.

AhR : « Aryl hydrocarbon Receptor », PXR : « Pregnane X Receptor », CAR : « Constitutive Androstane Receptor »

Les xénobiotiques traversent facilement la membrane cellulaire du fait de leur caractère lipophile. Dans le cytoplasme, ils se lient et activent des récepteurs tels que le AhR, PXR et CAR qui migrent dans le noyau et activent la transcription des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Ces enzymes permettent, dans la plupart des cas, l'élimination du xénobiotique.

Les xénobiotiques sont des petites molécules étrangères à l'organisme. Du fait de leur caractère lipophile, ils diffusent librement à travers la membrane plasmique des cellules. Ils sont alors détectés par des récepteurs (comme le AhR) qui agissent comme des facteurs de transcription et augmentent l'expression d'enzymes et de transporteurs du métabolisme des xénobiotiques catalysant une suite de réactions dépendantes les unes des autres, conduisant à l'élimination de ces xénobiotiques : ceux-ci sont tout d'abord activés (la plupart du temps, hydroxylés) par les enzymes de phase I comme par exemple les cytochromes P450 (CYP). Ils sont ensuite conjugués par les enzymes de phase II (ex : « glutathion S transférase » ou GST) qui ajoutent généralement un groupement hydrophile (ex : glutathion) sur la fonction activée. Cette fonctionnalisation augmente la solubilité du xénobiotique dans les fluides biologiques (urines, selles, sueurs) favorisant ensuite son élimination. Enfin, ces composés sont expulsés

hors de la cellule par des transporteurs actifs (consommant de l'ATP) de phase III (dont le MDR « multiple drug resistance ») et éliminés dans les urines.

Le AhR est communément appelé récepteur aux « dioxines », mais plus généralement de nombreux polluants persistants sont ligands de celui-ci, dont les PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxines (PCDD), les PolyChloroDibenzo-*p*-Furanes (PCDF) et les PolyChloroBiphenyles (PCB). Le ligand exogène le plus affiné pour le AhR est la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD, appelée également dioxine de Seveso), polluant environnemental libéré lors de combustions incomplètes, naturelles ou industrielles. Ce polluant est considéré comme un POP : en raison de son hydrophobicité et de sa résistance vis-à-vis du métabolisme des xénobiotiques, il s'accumule au niveau du tissu adipeux et du foie (Kim *et al.*, 2011). Les POP sont également détectés dans le cerveau humain (analyses post-mortem) (Dandekar *et al.*, 2004, Hurley *et al.*, 2004). Chez l'Homme, une exposition à de fortes doses de TCDD peut provoquer de nombreux effets toxiques à court terme :

- Des lésions dermatologiques comme la chloracné (Cohen *et al.*, 2004) apparaissent. L'éruption, caractéristique d'une intoxication à des agents chlorés, est la conséquence d'une dégénération des processus de différenciation des kératinocytes et des cellules des glandes sébacées.
- Un syndrome de cachexie caractérisé par un fort amaigrissement et une grande fatigue.
- Une altération des fonctions hépatiques due à une accumulation de lipides, une inflammation et une nécrose des hépatocytes.

A long terme, des études épidémiologiques ont associé une exposition aux dioxines à l'apparition de cancers, d'un diabète de type 2 et de pathologies cardiovasculaires (Marinkovic *et al.*, 2010). D'après les études publiées jusqu'à présent, les effets toxiques de la dioxine passent essentiellement par l'activation du AhR.

Les fonctions du AhR ont été tout d'abord étudiées chez les vertébrés et plus particulièrement chez les mammifères. Par la suite, des études phylogénétiques ont montré que ce récepteur est également présent chez les invertébrés chez lesquels il joue un rôle physiologique complètement différent de celui initialement décrit chez les mammifères.

B. Le AhR chez les vertébrés

1. Structure

La protéine du AhR murin est constituée de 805 acides aminés et son poids moléculaire est de 90 kDa chez la souris C57BL/6. Elle est constituée de trois principaux domaines : le domaine bHLH, le domaine PAS et le domaine de transactivation.

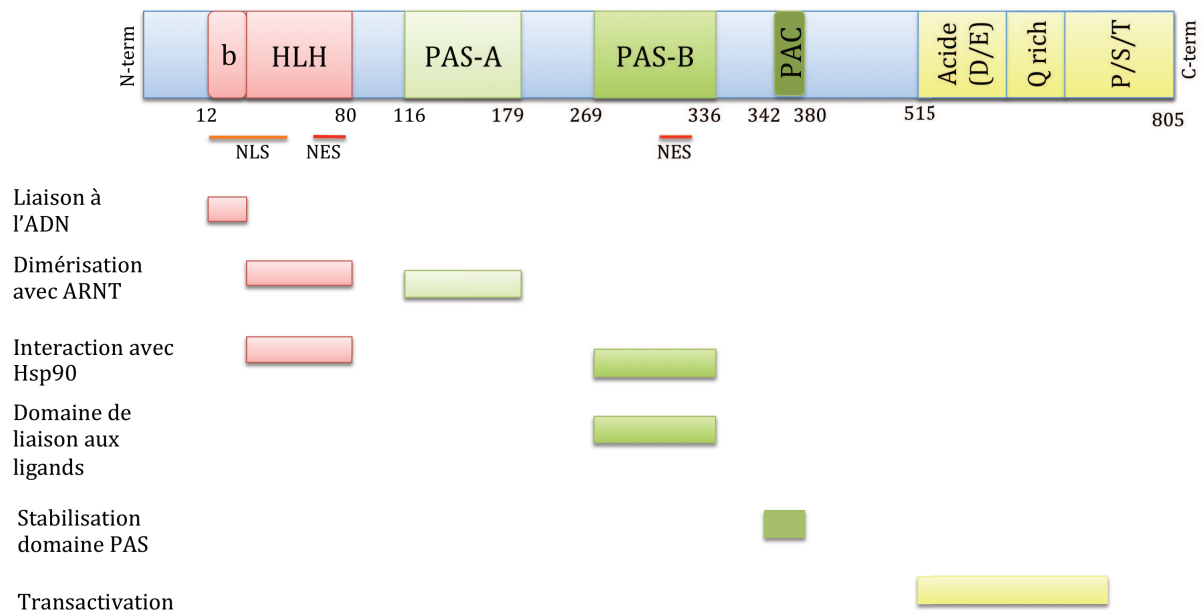


Figure 2: Représentation schématique des différents domaines du récepteur AhR murin (C57BL/6) et de leurs fonctions respectives.

En rouge, le domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix)

En vert, le domaine PAS (Per ARNT Sim) composé de deux sous-domaines (A et B) et du domaine PAC

En jaune, le domaine de transactivation C-terminal constitué de 3 sous-domaines : le domaine acide, le domaine riche en glutamine (Q rich) et le domaine riche en P/S/T Proline/Sérine/Thréonine.

a) Le domaine bHLH (basic Helix Loop Helix)

Le domaine bHLH du AhR est commun à d'autres facteurs de transcription comme Myc/Max et MyoD/E2A. Il est localisé dans la partie N-terminale de la protéine. Le domaine « basique » du motif intervient dans la liaison à l'ADN (du fait de la présence de résidus basiques chargés positivement et favorisant l'interaction avec l'ADN chargé négativement) tandis que le domaine HLH permet en partie l'hétérodimérisation avec ARNT, le co-

partenaire nucléaire du AhR, ainsi que la liaison avec une protéine chaperonne, Hsp90 (« Heat shock protein 90»).

Le domaine bHLH contient également une séquence de localisation nucléaire (NLS pour « Nuclear Localization Signal ») qui permet la translocation nucléaire du AhR après activation par un ligand. Le NLS est sous la forme de deux segments constitués d'acides aminés basiques (AA 13-16 : RKRR et AA 37-39 : KRH).

Le domaine bHLH possède aussi une séquence d'exportation nucléaire (NES pour « Nuclear Export Signal ») qui permet le passage du AhR dans le cytoplasme après la séquence des événements nucléaires.

b) *Le domaine PAS*

Le domaine PAS est un motif protéique très conservé au cours de l'évolution. Il est commun à de nombreuses protéines intervenant dans la détection et l'adaptation aux changements environnementaux. L'acronyme PAS provient de la première lettre de chacun des 3 membres fondateurs de la famille : PER, ARNT et SIM. Ce domaine a été ainsi, originellement défini sur la base de 275 acides aminés communs entre les protéines **Period** (Per), impliquée dans le rythme circadien, **ARNT**, acteur de la voie de signalisation du AhR et **Single-minded** (Sim), régulateur du développement neurologique chez la drosophile (Forster *et al.*, 2004, Hoffman *et al.*, 1991, Shi *et al.*, 2010). Cette famille est maintenant constituée de plus de 34 membres chez les mammifères, dont le AhR et les facteurs de la voie de signalisation de l'hypoxie. Avec l'émergence de ces nouveaux membres, le domaine PAS se définit par 2 séquences proches d'environ 70 acides aminés imparfaitement répétées, appelées PAS-A et PAS-B (Figures 2 et 3).

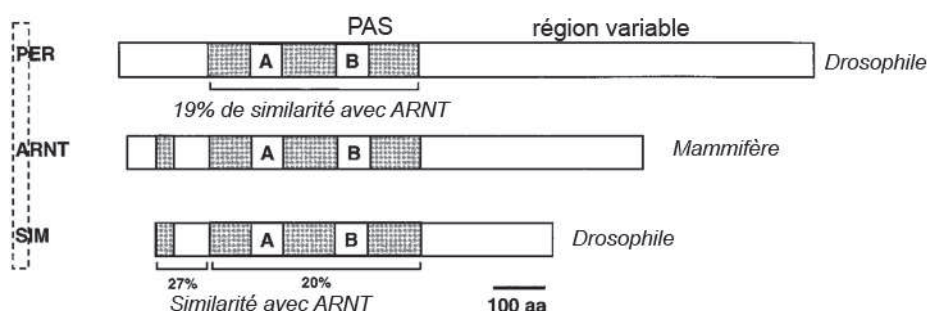


Figure 3: Structure des membres fondateurs de la famille PAS : Per, ARNT et Sim.

*Les différents domaines des protéines sont représentés : le domaine basique (b), le domaine hélice-boucle-hélice (HLH), le domaine PAS et le domaine variable à l'extrémité C-terminale. Le pourcentage d'homologies de SIM et PER par rapport à ARNT est indiqué (Gu *et al.*, 2000).*

Le domaine PAS-A du AhR, tout comme le domaine HLH, est impliqué dans la dimérisation avec ARNT.

Quand au domaine PAS-B, il intervient en partie dans la liaison avec une protéine chaperonne Hsp90 (Fukunaga *et al.*, 1995, Yan *et al.*, 2011) et surtout dans la liaison aux ligands. Le domaine PAS-B contient également une séquence d'exportation nucléaire (NES) (Traber *et al.*, 2012) qui régule l'exportation du AhR du noyau vers le cytoplasme (Figure 2).

Le motif PAC (« PAS Associated C-terminal domain »), récemment décrit, contribue au maintien d'une conformation correcte du domaine PAS adjacent (Hefti *et al.*, 2004). Ce motif, constitué de 40-45 acides aminés, est localisé du côté C-terminal du domaine PAS. Il est présent chez certaines protéines de la famille PAS, dont les protéines impliquées dans le cycle circadien (Ponting & Aravind, 1997).

c) Le domaine de transactivation

Le domaine de transactivation (TAD pour « TransActivation Domain ») peut être divisé en 3 parties chez la souris : une première partie (515-583) riche en résidus acides (glutamate, E et aspartate, D), une deuxième partie riche en glutamine (Q) (643-740) nécessaire à la liaison des cofacteurs (qui contribueront à la mise en place du complexe transcriptionnel de l'ARN polymérase II), et une dernière partie riche en proline/sérine/thréonine ou P/S/T (726-805) (Ko *et al.*, 1997). La séquence du TAD du AhR est très différente entre la souris et l'Homme avec seulement 58% d'homologie de séquence. Cette différence entre l'Homme et la souris soulève diverses hypothèses comme la divergence de recrutement des coactivateurs ou bien des niveaux d'induction des gènes différents.

Le domaine de transactivation est impliqué dans le recrutement de coactivateurs permettant la régulation de la transcription des gènes cibles. Les études portant sur l'identité de ces coactivateurs se sont surtout focalisées sur leur rôle dans la régulation du gène du Cyp1a1 de souris dans un modèle d'hépatocyte Hepa-1 traités par la TCDD. Des expériences d'immunoprécipitation et de précipitation de la chromatine (ChIP) ont permis de mettre en évidence les coactivateurs interagissant avec les séquences génomiques liant le complexe AhR/ARNT. On observe, ainsi, le recrutement de coactivateurs possédant une activité histone acétyltransférase dont SRC-1 (« steroid receptor coactivator 1 »), SRC-2¹ ou p/CIP (« p300/CBP cointegrator protein, SRC-3 »). Ces trois protéines interagissent directement avec le AhR alors qu'ARNT ne peut lier que SRC-1 et SRC-2. De plus, les auteurs ont

¹ Remarque : les protéines SRC appartiennent à la famille PAS

également montré l'implication de BRG-1 (« Brahma/SWI2-Related Gene 1 protein »), coactivateur utilisant l'ATP capable de dissocier mécaniquement les nucléosomes et de décompacter la chromatine au niveau des promoteurs de gènes cibles. Enfin, le AhR interagit également avec des sous-unités du complexe TRAP/DRIP/ARC/Mediator (autre co-activateur interagissant avec l'ARN polymérase II) comme Med130 et Med 220 (Hankinson, 2005).

Le AhR peut également recruter des corépresseurs tels que SMRT (« Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors ») (Rushing & Denison, 2002). Ce corépresseur est connu pour réprimer l'activité transcriptionnelle de récepteurs nucléaires liés à l'ADN sans ligand comme par exemple le récepteur aux glucocorticoïdes. Bien que l'interaction directe entre AhR/ARNT et SMRT ait été montrée par plusieurs équipes (Nguyen *et al.*, 1999, Rushing & Denison, 2002), la répression transcriptionnelle du AhR (activé par la TCDD) par SMRT est controversée.

La variation tissulaire du niveau d'expression de l'ensemble de ces corégulateurs peut constituer un facteur important permettant d'expliquer des différences de sensibilité et de réponses transcriptionnelles vis-à-vis de ligands du AhR. De plus les variations intrinsèques de la séquence du récepteur Ah peuvent également expliquer les différences de sensibilité.

2. Polymorphismes du AhR murin

Des polymorphismes du AhR ont ainsi été identifiés chez la souris, et induisent des différences de sensibilité face à la toxicité des polluants environnementaux (Schmidt *et al.*, 1993). Par exemple, la souche consanguine DBA, possède un récepteur, appelé AhR^d avec une affinité 10 à 100 fois plus basse ($K_d = 1,66\text{nM}$) pour les ligands agonistes comme la TCDD que le récepteur présent chez la souche C57, appelé AhR^{b-1} ($K_d=0,27\text{nM}$). Ces 2 allèles codent respectivement des protéines de 104 kDa (soit 848 acides aminés) et 95 kDa (soit 805 acides aminés). Il existe deux autres polymorphismes retrouvés chez les souches BALB/c et *Mus spretus* appelés respectivement AhR^{b-2} et AhR^{b-3}. Ceux-ci ont la même affinité que celui correspondant à l'allèle AhR^{b-1} mais les protéines ont une masse moléculaire de 104 kDa pour l'allèle AhR^{b-2} et 105 kDa pour l'allèle AhR^{b-3} (Ema *et al.*, 1994). La comparaison entre les allèles AhR^d et AhR^{b-1} a permis de mettre en évidence une modification de séquence d'un nucléotide (SNP, « Single nucleotide polymorphism ») (Figure 4). La mutation du codon stop (présent dans AhR^{b-1}) en arginine (R, présente dans AhR^d) provoque une élongation de 43 acides aminés du récepteur (ce qui explique la différence de taille de 9 kDa entre les 2 protéines) (Chang *et al.*, 1993, Harper *et al.*, 2002). La différence d'affinité

des 2 allèles n'est toutefois pas due à cette extension mais à la présence d'un deuxième polymorphisme associé (SNP) dans le domaine PAS et plus précisément dans le domaine de liaison aux ligands : l'allèle AhR^{b-1} possède une alanine (A) en position 375 alors que l'allèle AhR^d possède une valine (V) (Ema et al., 1994).

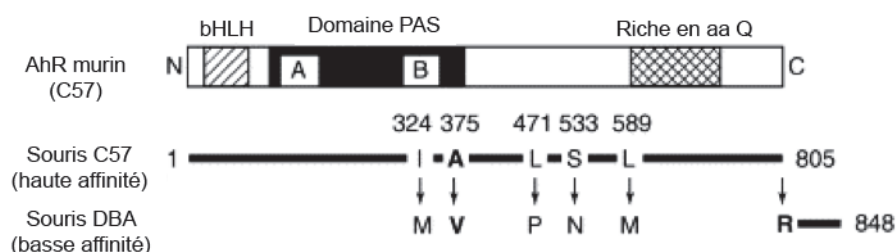


Figure 4 : Représentation schématique du AhR murin et de ses polymorphismes.

Les différents polymorphismes identifiés dans la séquence des récepteurs de haute (souris C57BL/6) et de basse (souris DBA) affinité sont représentés. Seules les mutations de l'alanine 375 (A375V) et du codon stop (Stop805R) ont des conséquences sur la fonction du AhR (Mimura & Fujii-Kuriyama, 2003).

3. Phylogénie

Le AhR est très conservé entre les espèces. Il est exprimé chez les premiers vertébrés comme les Agnathes, les poissons cartilagineux et les poissons osseux, qui sont les plus anciens chordés connus (Hahn et al., 1997). Chez les poissons, différentes isoformes du AhR sont retrouvées ; ainsi, il existe fréquemment au moins un deuxième gène codant le AhR qui résulte d'une duplication génique.

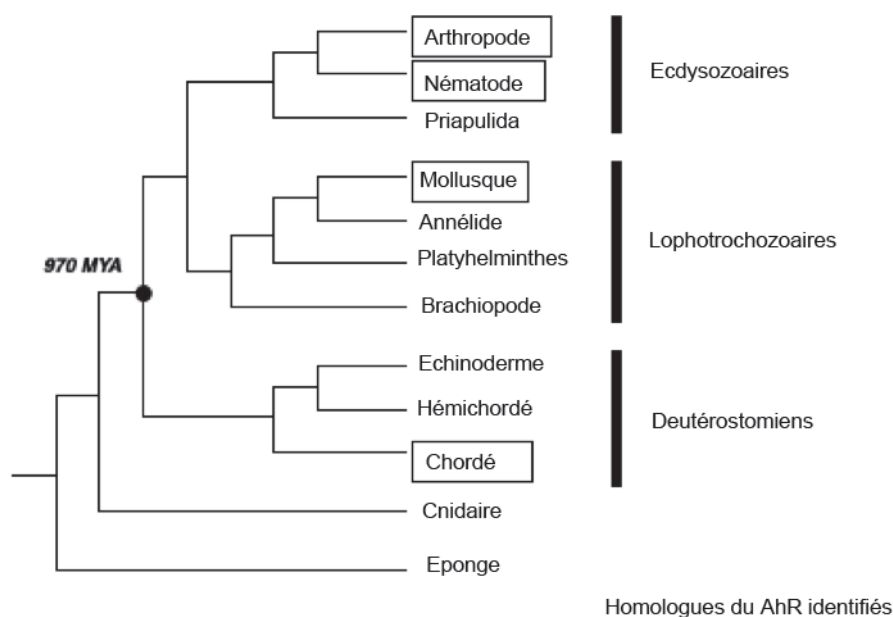


Figure 5: Arbre phylogénétique du récepteur AhR.

*Identification des homologues du AhR dans le règne animal (Hahn, 2002). Le AhR est retrouvé dans la classe des chordés (dont dérivent les mammifères), la classe des arthropodes (dont font partie les drosophiles), la classe des nématodes (*C. elegans*) ainsi que dans la classe des mollusques.*

Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) qui est un modèle classique d'étude en écotoxicologie, trois protéines AhR ont été mises en évidence : AhR1a, AhR1b et AhR2 (Karchner et al., 2005). AhR1a, dont le gène est localisé au niveau du chromosome 16, est principalement exprimé dans le foie et le rein et ne lie pas les ligands exogènes comme la dioxine ou la β -naphtoflavone (Andreasen et al., 2002). Sa fonction n'a pas encore été élucidée. Contrairement à AhR1a, les protéines AhR1b et AhR2 (dont les gènes sont adjacents sur le chromosome 22) ont la capacité de lier les ligands classiquement décrits chez les mammifères. AhR1b est exprimé très tôt durant le développement embryonnaire dans le cerveau, le cœur et les gonades contrairement à AhR2 dont l'expression est ubiquitaire. Le AhR2 est impliqué dans la réponse aux xénobiotiques alors que AhR1b possède une fonction plus physiologique, mais qui reste encore à caractériser (Karchner et al., 2005).

Des homologues du AhR ont également été identifiés chez les oiseaux, les reptiles et certains amphibiens comme la grenouille (Hahn, 2002).

Chez les mammifères, une unique isoforme du AhR, AhR1, a été identifiée (Hahn et al., 2006).

4. Expression et régulation de l'expression du AhR

Le AhR murin est codé par un gène localisé au niveau du chromosome 12, alors que le AhR humain est situé dans le chromosome 7. Le promoteur du gène (murin et humain) ne contient ni boîte « TATA » ni boîte « CCAAT », ce qui caractérise généralement les gènes de ménage (Garrison & Denison, 2000, Schmidt *et al.*, 1993). Néanmoins, des éléments de réponse pour les facteurs de transcription AP1 (« activating protein 1 ») et Sp1 (« Stimulating protein 1 ») ont été identifiés dans le promoteur (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010).

In vitro, le traitement de cellules humaines de cancer mammaire (MCF7) par un agent (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ou TPA) stimulant le facteur de transcription AP-1 augmente l'expression du AhR (Spink *et al.*, 1998). Le AhR est également régulé par des mécanismes épigénétiques. Le traitement de cellules hépatiques murines Hepa-1 par des inhibiteurs d'histones désacétylases provoque une augmentation de l'activité basale du promoteur du AhR (Garrison *et al.*, 2000).

In vivo, de nombreuses études ont montré que le AhR était exprimé de façon ubiquitaire avec, cependant, des variations du niveau d'expression selon les tissus. Chez l'Homme, les plus hauts niveaux d'expression sont retrouvés chez l'adulte dans le placenta, le poumon et le foie (Dolwick *et al.*, 1993). Le AhR semble exprimé très tôt durant le développement embryonnaire. L'équipe du Pr. Abbott a étudié l'expression du AhR dans des embryons de souris C57BL/6N par des expériences d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie. Le AhR semble exprimé au stade précoce de l'organogenèse (du jour 9 jusqu'au jour 13 de gestation) dans le neuroépithélium et le cœur ; son expression décroît ensuite dans ces tissus (Abbott *et al.*, 1995). Par opposition, son expression augmente graduellement dans le foie (début d'expression à E12). Le AhR est ensuite exprimé dans les autres tissus dont les reins, les poumons, les muscles et l'épiderme. Durant le développement des yeux, le AhR est exprimé au niveau de la couche interne de la rétine (Jain *et al.*, 1998).

Le partenaire du AhR, ARNT, est généralement exprimé avec celui-ci mais il existe aussi des différences d'expression dans certains tissus ; ceci peut être mis en relation avec les multiples fonctions d'ARNT qui lie d'autres partenaires protéiques (Schmidt & Bradfield, 1996).

5. Voie de signalisation du AhR

a) Le complexe cytoplasmique du AhR

Le AhR est généralement représenté comme faisant partie intégrante d'un complexe cytoplasmique constitué d'un dimère de protéines chaperonnes ou « Heat shock protéines » 90 (Hsp90), d'une protéine XAP2/Ara9/AIP et d'une protéine co-chaperonne p23.

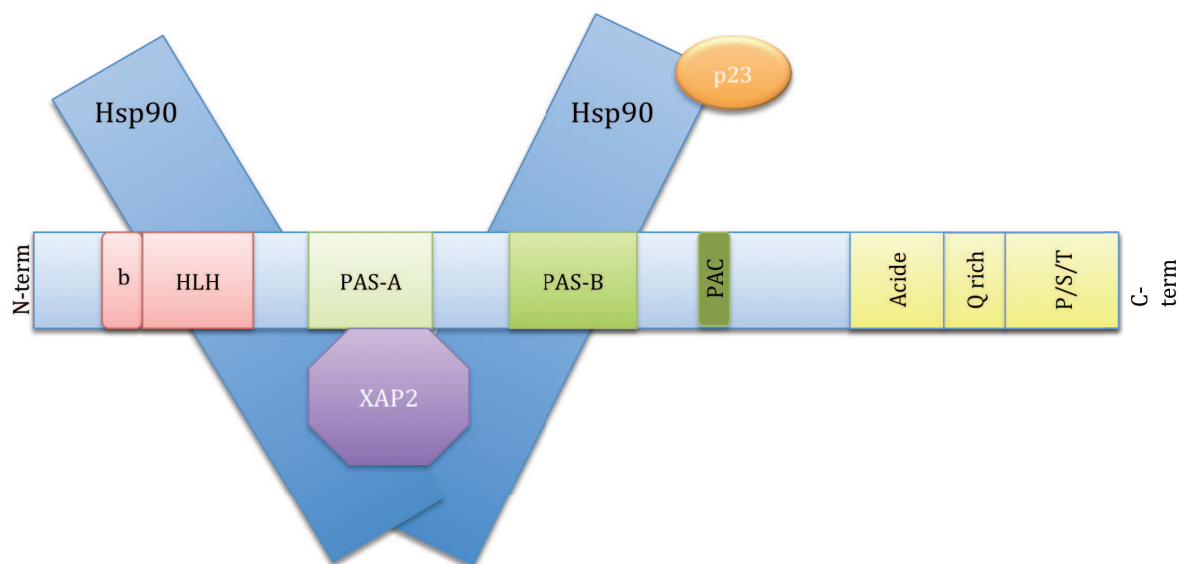


Figure 6 : Représentation schématique du complexe cytoplasmique du AhR.

Les 2 protéines chaperonnes Hsp90 interagissent, au niveau de leur domaine central, avec les domaines HLH et PAS-B du AhR alors que la protéine co-chaperonne p23 interagit avec Hsp90 au niveau de son domaine N-terminal. La protéine XAP2 se lie au AhR au niveau de sa partie centrale et aux Hsp90 au niveau de leur partie C-terminale (d'après (Petrulis & Perdew, 2002)).

Les protéines Hsp90 sont composées de trois domaines : la partie N-terminale (acides aminés (AA) 9-236), une partie centrale (AA 272-617) et la partie C-terminale (AA 629-732). Le AhR, comme les récepteurs aux œstrogènes, interagit avec la région centrale des protéines Hsp90 tandis que XAP-2 (« X-Associated Protein 2 ») se lie à leur domaine C-terminal (Bell & Poland, 2000, Ma & Whitlock, 1997, Meyer & Perdew, 1999).

Les protéines chaperonnes Hsp90 se lient au niveau du domaine bHLH et du domaine PAS-B masquant ainsi les séquences de localisation nucléaire et empêchant ainsi la translocation du AhR (Ikuta *et al.*, 1998, Lees & Whitelaw, 1999). Les Hsp90 sont également impliquées dans la stabilité du AhR ; ainsi, la demi-vie du AhR au sein du complexe cytoplasmique est beaucoup plus élevée que celle du AhR libre. Les Hsp90 contribuent à protéger le AhR de l'action du système « ubiquitine-protéasome ». De plus, elles

maintiennent le récepteur dans une conformation favorisant la liaison d'un ligand. Cette propriété est critique puisque la dissociation *in vitro* des Hsp90 rend la protéine AhR incapable de lier son principal ligand exogène, la TCDD, ce qui soulève la question des propriétés du AhR nucléaire décrites plus haut dans l'étude d'Ikuta (Petrulis & Perdew, 2002). Il est ainsi possible que le AhR nucléaire (lors de la phase de prolifération des kératinocytes) soit en mesure de lier d'autres ligands (endogènes) ou que sa forme phosphorylée (sur la sérine 68) soit capable d'agir indépendamment de la liaison à un ligand dans une voie de signalisation alternative. Enfin, les Hsp90 ont la propriété de réprimer la liaison entre le AhR et ARNT (Petrulis & Perdew, 2002).

La liaison du ligand provoque la dissociation de la première Hsp90 liée au domaine bHLH, et ainsi le démasquage du domaine de localisation nucléaire entraînant la migration nucléaire du AhR. Dans le noyau, la libération de la protéine Hsp90 liée au domaine PAS-B intervient simultanément avec l'hétérodimérisation de son co-partenaire ARNT (Lees & Whitelaw, 1999).

La protéine XAP2 (« HBV X-associated protein 2 ») est une protéine de 38 kDa qui partage de fortes homologues de séquence avec les immunophilines² FKBP12 et FKBP52 (Carver et al., 1998). Dans la littérature, cette protéine est aussi appelée AIP (« AhR interacting protein ») (Ma & Whitlock, 1997) ou ARA9 (« AhR associated protein 9 ») (Carver & Bradfield, 1997). XAP2 interagit avec le AhR au niveau de son domaine PAS-A et avec les Hsp90 au niveau de leur domaine C-terminal. Elle possède un rôle important dans la conformation initiale et la stabilité du AhR non lié à son ligand, en limitant son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome, comme le font également les Hsp90 (Kazlauskas et al., 2000). L'équipe du Pr. Perdew a montré que la transfection transitoire de XAP2 et de AhR dans des cellules COS-1 entraîne une augmentation du niveau de la protéine AhR et, ainsi, une augmentation de son activité transcriptionnelle en présence de ligand (ce qui est légitime si la quantité de AhR est plus importante) (Meyer & Perdew, 1999). Cette protéine module également la localisation cellulaire du AhR. En effet, dans le cytoplasme, XAP2 liée aux protéines Hsp90 permet l'ancrage du récepteur au cytosquelette d'actine, ce qui empêche sa translocation nucléaire (Traber *et al.*, 2012). De plus, XAP2 modifie la localisation cellulaire du AhR en perturbant l'interaction entre le NLS et l'importine β

² Les immunophilines sont des protéines chaperonnes qui possèdent, pour la plupart, une activité peptidylpropyl-isomérase. Elles sont connues pour être des cibles des immunosuppresseurs comme la cyclosporine.

(récepteur permettant l'importation du AhR dans le noyau) (Petrulis & Perdew, 2002). Dans la cellule, en absence de ligand exogène, il existe ainsi deux populations de AhR, une population cytoplasmique liée à XAP2 et une population nucléaire sans XAP2 (Petrulis & Perdew, 2002). Cette observation suggère que chaque complexe du AhR pourrait fonctionner de manière distincte. Cependant, aucune étude n'a été entreprise pour étudier cette question.

La protéine p23 interagit également avec ce complexe cytoplasmique mais ne lie pas directement le AhR et est donc considérée comme une co-chaperonne. Elle est associée à la partie N-terminale d'une des deux protéines chaperonnes Hsp90 de manière ATP-dépendante. Cette protéine joue un rôle dans la dissociation entre Hsp90 et le AhR après liaison du ligand (Kekatpure et al., 2009).

Au niveau du cytoplasme, le AhR peut aussi former un complexe avec d'autres protéines dont la **kinase c-Src**. La liaison d'un ligand du AhR à ce complexe provoque sa dissociation et la libération de c-Src dans le cytoplasme, qui peut alors activer ses cibles par phosphorylation. Notre laboratoire a montré que cette libération (provoquée par la TCDD) conduisait à une modification de la structure des points d'adhérence focaux de la cellule et à une modification de ses propriétés migratoires (Tomkiewicz et al., 2012).

Dans certaines conditions, le AhR peut toutefois être nucléaire. En effet, dans la lignée de kératinocytes HaCaT, la densité cellulaire influence la localisation du AhR dans la cellule. Lorsque les cellules sont éparses, le récepteur est majoritairement nucléaire, puis lorsque les cellules atteignent la confluence, il devient majoritairement cytoplasmique (Ikuta et al., 2004a). Le mécanisme suspecté serait la phosphorylation de la sérine 68 localisée dans le domaine d'exportation nucléaire (NES) par la p38 MAPkinase qui est activée pendant la phase de prolifération des cellules. Cette phosphorylation inhibe l'exportation du AhR qui reste alors bloqué dans le noyau. L'importance de cette localisation nucléaire pendant la phase de prolifération n'est pas connue (une seule étude). Il est possible que, dans ces conditions, le AhR régule l'expression de gènes qui contribuent au phénotype prolifératif des kératinocytes. La majorité des études réalisées sur des lignées cellulaires décrivent toutefois le AhR comme faisant partie du complexe cytoplasmique précité.

b) Le complexe nucléaire du AhR : Interaction avec ARNT

ARNT, nommé aussi HIF1 β (« Hypoxia Inducible Factor 1 β »), est un autre membre de la famille bHLH/PAS. Il est exprimé de manière ubiquitaire et est impliqué dans différentes voies de signalisation dont l'hypoxie et la réponse aux xénobiotiques :

- en réponse à de faibles niveaux en oxygène (hypoxie), ARNT s'hétérodimérise avec HIF1 α et régule la transcription de gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse dont le VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor »).
- en réponse à un xénobiotique, ARNT se lie au AhR *via* ses domaines bHLH et PAS-A ; le complexe régule la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (voir paragraphe suivant).

ARNT possède un rôle essentiel durant le développement embryonnaire puisque son absence dans le modèle « Knock-Out » entraîne une létalité (mortalité à 9 jours de gestation due à des défauts précoces d'angiogenèse).

Une isoforme d'ARNT, ARNT2, a été identifiée chez les vertébrés (Hirose et al., 1996). ARNT2 a une expression restreinte au cerveau et au rein alors que l'expression d'ARNT est ubiquitaire. ARNT2 possède plus de 90% d'homologie de séquence avec ARNT (Dougherty & Pollenz, 2008). Des études *in vitro* ont montré que ARNT2 était capable de se lier au AhR avec la même affinité qu'ARNT. Cependant, cette liaison dépendrait de la nature et de l'affinité du ligand lié au AhR (Hankinson, 2008). Contrairement aux souris ARNT^{-/-}, les souris ARNT2^{-/-} ont un développement embryonnaire normal mais meurent prématurément après leur naissance. Elles présentent un défaut de développement de l'hypothalamus (Keith et al., 2001). Ces résultats suggèrent que, malgré leur forte homologie de séquence, les 2 isoformes possèdent en plus de leurs rôles communs (notamment la réponse à l'hypoxie), des fonctions différentes.

c) Voie d'activation du AhR ligand-dépendante

Les ligands du AhR sont en général très lipophiles et diffusent à travers la membrane plasmique des cellules. La liaison entre le ligand et le AhR induit un changement de conformation du récepteur qui provoque l'exposition du signal de localisation nucléaire présent dans la région N-terminale du récepteur. Le complexe formé du AhR, de la protéine Hsp90 restante, de p23 et du ligand, migre alors dans le noyau. Les protéines chaperonnes

vont alors se dissocier et le AhR se lier avec son co-partenaire ARNT. Cette liaison masque la séquence d'exportation nucléaire du AhR. L'hétérodimère AhR/ARNT se lie à des éléments de réponse appelés « Xenobiotic Responsive Element » (XRE) localisés dans les promoteurs de gènes cibles dont la séquence consensus est 5'-TNGCGTG-3'. Lors de la liaison du complexe à l'ADN, ARNT reconnaît la partie « GTG » de la séquence alors que le AhR se lie au demi site « TNGC » (Bacsi *et al.*, 1995, Schmidt & Bradfield, 1996). Plusieurs gènes cibles sont des enzymes du métabolisme des xénobiotiques telles que le cytochrome P450 1A1, qui sont impliquées dans l'élimination du xénobiotique (Figure 5).

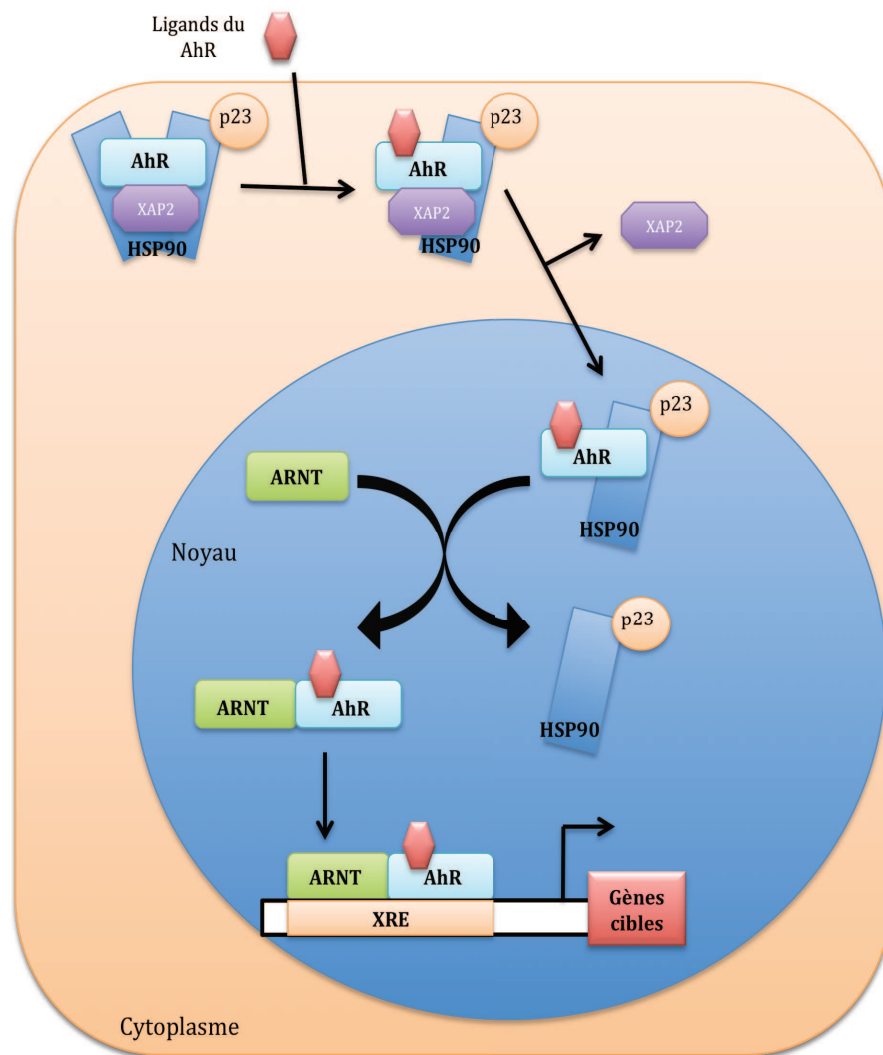


Figure 7: Voie de transduction du AhR.

Le AhR fait partie d'un complexe cytoplasmique qui comprend 2 protéines chaperonnes HSP90, une protéine co-chaperonne p23 et la protéine XAP2 (HBV X-associated protein 2) ou AIP (AhR Interacting Protein). Après liaison de son ligand, le AhR migre dans le noyau et s'hétérodimérise avec son partenaire ARNT (Aryl Hydrocarbon receptor Nuclear Translocator). Cet hétérodimère se lie à l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE, 5'-TNGCGTG-3') dans les promoteurs des gènes cibles dont il active la transcription.

Cependant, d'autres éléments de réponse, capables de lier le complexe AhR/ARNT, ont été mis en évidence (Gouedard et al., 2004). La spécificité de liaison à ces éléments de réponse alternatifs dépend de la nature du ligand.

Site	Séquence du XRE
Site canonique	A/T N G C G T G A/G G/C A
Site alternatif localisé dans le gène PON1	C G G C G G G C C
Site alternatif localisé dans le gène BAX1	G G G C G T G G T G

Tableau 1: Séquence de différents XRE reconnus par le AhR.

PON1 (« *Paraoxonase 1* ») et *BAX* (« *Bcl-2-associated X protein* »)

La voie de transduction présentée en figure 7 peut être influencée par des événements post-traductionnels et notamment des phosphorylations : Ikuta et ses collaborateurs ont ainsi montré que lorsque les sérines S12, S16 et S36, localisées dans le NLS, sont phosphorylées par la protéine kinase C (PKC), le AhR est bloqué dans le cytoplasme même en présence de ligand (Ikuta et al., 2004b). On peut supposer que ce blocage est lié à un défaut d'interaction entre le NLS et le transporteur qui permet la translocation nucléaire du AhR. De plus, comme évoqué précédemment (chapitre I.B.5.a), les auteurs ont observé, que dans les kératinocytes humains HaCaT, la localisation du AhR dépendait de la densité cellulaire et de la phosphorylation de la sérine 68 située au niveau du NES par la MAPKinase p38 qui bloque l'export du AhR du noyau vers le cytoplasme (Ikuta et al., 2004b). En résumé, les phosphorylations qui affectent les signaux de localisation (NLS et NES) sont inhibitrices. Il est intéressant de noter que ceux-ci ne sont pas phosphorylés par les mêmes kinases, suggérant une régulation de la localisation du AhR dépendante du type de kinase activée ou de la balance d'activation entre ces kinases (notamment PKC et p38 MAPK).

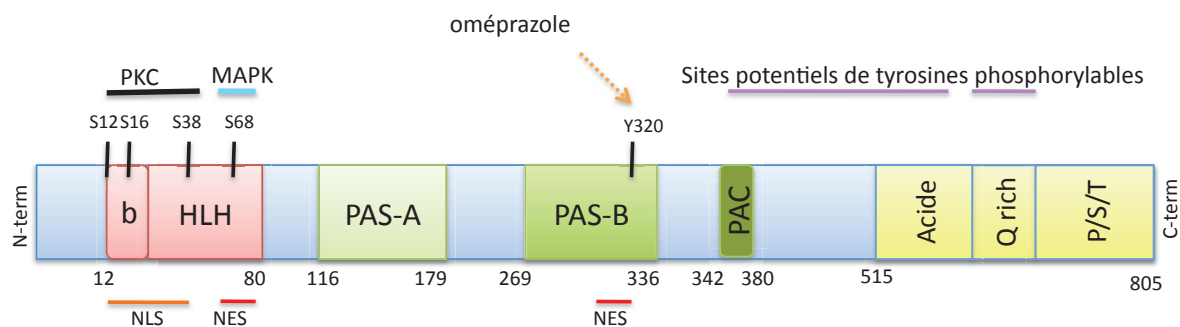


Figure 8 : Représentation schématique des différents sites de phosphorylation du AhR murin.

Le AhR est phosphorylé au niveau de la séquence de localisation nucléaire (NLS) par la protéine kinase C (S12, S16, S38). La sérine 68 localisée dans la séquence d'exportation nucléaire (NES) est phosphorylée par la MAPKinase. De plus, des sites potentiels de tyrosines « phosphorylables » ont été identifiés dans la partie C-terminale. Enfin, l'oméprazole, molécule antiulcéreuse, provoque la phosphorylation de la tyrosine 320 via l'action de protéine kinases (chapitre I.B.5.c.1).

Les ligands du AhR sont multiples et peuvent être classés en plusieurs catégories :

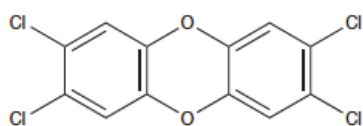
(1) Les ligands exogènes

La principale source d'exposition chez les animaux et l'Homme aux ligands exogènes provient de leur alimentation (90%). Les ligands exogènes peuvent être groupés selon leurs origines : « synthétique » ou naturelle (Denison & Nagy, 2003).

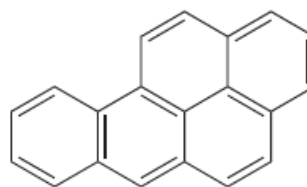
- Les ligands d'origine synthétique³ incluent des polluants environnementaux dont les HAHs (hydrocarbures aromatiques halogénés) et les HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques) (Figure 9). Les ligands de la famille des HAHs ont une forte affinité vis-à-vis du récepteur ; la TCDD, par exemple, a une constante de dissociation de l'ordre du nM pour le AhR humain. De plus, ces molécules sont très stables et s'accumulent dans l'environnement et les graisses animales. Les ligands de la famille des HAP ont une affinité moins importante, de l'ordre du μ M. La plupart de ces ligands ont comme caractéristique structurale d'être aromatique et plan. De plus, la plupart de ces polluants provoquent de nombreux effets toxiques chez les organismes vivants ; par exemple, le benzo(a)pyrène (BaP) a été classé cancérigène par l'OMS (organisation mondiale de la santé) du fait de sa génotoxicité (tout comme 14 autres HAP dont certains sont aussi des ligands du AhR).

³ Les dioxines et certains autres polluants sont également produits en petite quantité lors d'éruptions volcaniques et de feux de forêt.

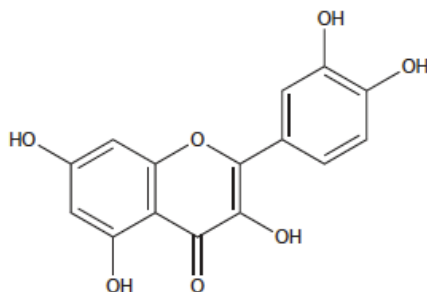
- Des ligands d'origine naturelle, apportés par l'alimentation, ont également été identifiés comme agonistes et antagonistes du AhR. Par exemple, le resvératrol (3,5,4' trihydroxystilbène), qui appartient à la famille des polyphénols, a été identifié comme un agoniste du AhR. Il est présent dans certains fruits comme le raisin et possède une activité anti-oxydante et anti-inflammatoire reconnues. D'autres molécules, dont les flavonoïdes, regroupent de nombreux composés naturels, ligands du AhR : la quercétine (présente dans certaines plantes comme dans le *Capparis spinosa*) est décrite comme un agoniste alors que l' α -naphtoflavone, dérivée synthétique des flavonoïdes, est couramment utilisée comme antagoniste du AhR. Cette molécule a la capacité d'empêcher la liaison des HAP et HAH sur le AhR tout en étant un agoniste partiel ou inverse des voies alternatives.



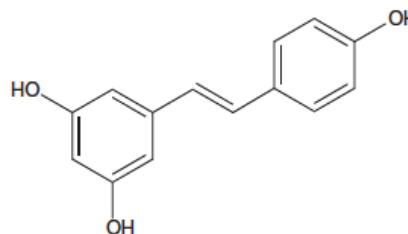
2,3,7,8 TétrachloroDibenzo-p-Dioxine



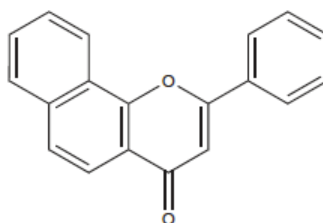
Benzo(a)pyrène



Quercétine



Resvérétrol



α -naphtoflavone

Figure 9 : Exemples de ligands exogènes du AhR.

(2) Les ligands endogènes

A ce jour, le ou les ligands physiologiques du AhR ne sont pas encore connus avec certitude. Cependant de nombreux candidats potentiels ont été identifiés et sont des régulateurs de l'expression de la batterie de gènes dépendants du AhR. Les ligands présumés incluent des dérivés du tryptophane et des indoles, l'acide arachidonique, certains leucotriènes (Lipoxine A4) et des métabolites de l'hème (bilirubine et biliverdine) (figure 10). Parmi ces ligands, les dérivés du tryptophane ont été les plus étudiés. Le tryptophane est un acide aminé essentiel. Il est métabolisé en de nombreuses molécules actives comme la sérotonine et la cynurénine. Un article récent montre que dans des cellules de gliomes humains, la cynurénine se lie au AhR et provoque sa translocation nucléaire ainsi que l'activation de ses gènes cibles (Opitz et al., 2011). De plus, le 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), produit lors de l'irradiation du tryptophane par les ultra-violets (et ainsi produit naturellement dans la peau), a été identifié comme un ligand du AhR et un activateur du Cyp1A1 (Rannug *et al.*, 1987, Wei *et al.*, 1998). Cette molécule possède une très haute affinité pour le AhR (de l'ordre du nM comme la TCDD). Le FICZ est surtout produit dans les kératinocytes, il est rapidement converti par le Cyp1A1 et ses métabolites sont retrouvés dans les urines humaines (Wincent et al., 2009). Cet agoniste puissant du AhR se différencie ainsi significativement des HAHs qui sont, de par leur lipophilie et leur résistance au métabolisme des xénobiotiques, généralement persistants et non métabolisés.

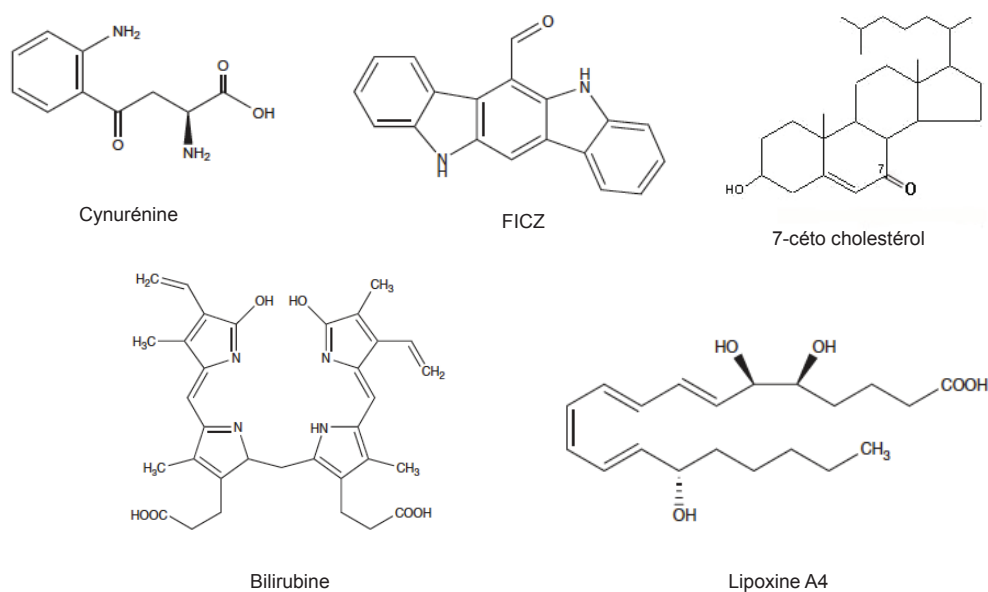


Figure 10 : Exemples de ligands endogènes du AhR.

FICZ : 6-FormylIndolo[3,2-b]CarbaZole

D'autres métabolites endogènes comme le 7-cétocholestérol, le principal produit spontané d'oxydation du cholestérol, retrouvé dans les plaques d'athérosclérose, ont été identifiés comme un antagoniste du AhR à des concentrations physiologiques (Savouret et al., 2001). Cependant les conséquences physiologiques de l'action de cet antagoniste n'ont pas encore été explorées.

Le stress de cisaillement a aussi la capacité d'induire le Cyp1A1 *via* le AhR. Dans ce cas, l'activation du AhR est dépendante des lipoprotéines de basse densité (ou LDL) modifiées par le stress (Mcmillan & Bradfield, 2007a). Toutefois, aucune liaison directe entre le AhR et les LDL modifiées n'a été montrée.

(3) Les sAhRMs (« selective AhR Modulators »)

En parallèle de ces études, le concept de sAhRM a vu le jour (développé par le Dr. Stephen Safe). Ce concept consiste à sélectionner des ligands agissant sélectivement sur une seule voie de signalisation; dans ce cadre, Stephen Safe s'est focalisé sur la conception de ligands anti-œstrogéniques (propriétés de plusieurs ligands exogènes du AhR comme la TCDD) (Holcomb & Safe, 1994) dans un but de pharmacologie anti-tumorale (tissus œstrogéno-dépendants) mais sans les effets toxiques comme ceux de la TCDD. Ils ont identifié le 6-méthyl-1,3,8-trichlorodibenzofurane (6-MCDF) et le diindolylméthane (DIM) (Mcdougal *et al.*, 2001, Mcdougal *et al.*, 1997) (Figure 11). Ces deux composés non toxiques, inhibent la croissance tumorale dans plusieurs modèles de cancers chez le rongeur (Fritz *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009).

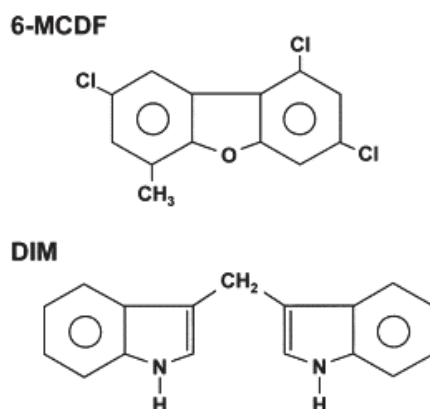


Figure 11: Structures de 2 sAhRM : le 6-méthyl-1,3,8-trichlorodibenzofurane (6-MCDF) et le diindolylméthane (DIM).

Plus généralement, de nouveaux ligands alternatifs du AhR ont ensuite été développés pour leur propriété d'activation des voies de signalisations alternatives comme par exemple,

l'induction de l'enzyme PON1 (Paraoxonase 1), connue pour son activité anti-athérosclérotique. Par ailleurs, ces activateurs ont, pour la plupart, été décrits comme des antagonistes du AhR du fait de leur capacité à bloquer l'activation du Cyp1A1 par ses ligands classiques.

d) Voies de signalisation indépendantes de la liaison à un ligand

En plus de la régulation du AHR par des ligands, l'activité de ce récepteur peut également être modulée par différentes régulations post-traductionnelles.

Phosphorylations : le AhR et son partenaire ARNT peuvent être phosphorylés au niveau de résidus sérine/thréonine par différentes kinases dont c-Src, les protéines kinases A et C (PKA, PKC) (Henklova et al., 2008) et la p38 MAPKinase.

Comme décrit auparavant, la phosphorylation par la PKC des sérines S12, S16, S68 et la phosphorylation de la sérine S68 par la p38 MAPK régulent la localisation et/ou l'activité du AhR (Figure 8). Des études ont montré que l'augmentation intracellulaire d'AMP cyclique (AMPC, activateur de la protéine kinase A) provoque la phosphorylation du AhR par la PKA et sa translocation nucléaire dans les cellules Hepa-1 (lignée murine d'hépatocyte) (Oesch-Bartlomowicz et al., 2005). Les auteurs précisent que, dans ce cas, ARNT ne co-précipite pas avec cette forme nucléaire du AhR. Cette translocation nucléaire du AhR n'influence pas l'expression du Cyp1a1, ce qui suggère l'activation d'une réponse alternative encore inconnue. L'oméprazole, inhibiteur des pompes à protons utilisé comme antiulcéreux, induit l'expression du Cyp1a1 *via* le AhR mais sans le lier directement (Dzeletovic et al., 1997). Ce processus impliquerait la phosphorylation de la tyrosine 320 du AhR par des protéines kinases activées par l'oméprazole (Backlund & Ingelman-Sundberg, 2005).

SUMOylations: récemment, des sites de SUMOylation ont été mis en évidence : un premier site dans le domaine bHLH et un deuxième dans le domaine de transactivation. La SUMOylation augmente la stabilité du AhR en inhibant son ubiquitinylation. De plus, cela entraîne également une répression de l'activité de transactivation du AhR. Le traitement de cellules MCF-7 par la TCDD entraîne une diminution du niveau de AhR « SUMOylé » dans le noyau (Xing et al., 2012). La SUMOylation semble donc être associée à la stabilisation de la forme cytoplasmique du AhR (tout comme l'association aux Hsp90).

Ubiquitinylation : l'ubiquitinylation du AhR est aussi une modification post-traductionnelle importante qui sera évoquée dans le chapitre I.B.6.a.

6. Régulation de la protéine AhR

Le niveau d'expression de la protéine AhR peut être régulé de 2 façons : soit par dégradation par le protéasome, soit par l'action d'une autre protéine bHLH/PAS : AhRR (« Aryl hydrocarbon Receptor Repressor »). La régulation de la quantité du AhR joue deux rôles importants. Premièrement, ce processus permet de contrôler l'amplitude et la durée de l'activation ou de la répression transcriptionnelle du complexe AhR/ARNT. Deuxièmement, la protéolyse du AhR rend plus disponible son partenaire ARNT qui peut alors agir dans d'autres voies de signalisation, dont l'hypoxie.

a) Dégradation dépendante du protéasome

Après liaison à son ligand, le AhR est rapidement dégradé. En effet, la concentration de la fraction nucléaire du AhR suite à la liaison de la TCDD est maximale après 1 à 2 heures de traitement puis décline. L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome 26S (MG132) suggère que cette diminution est dépendante du protéasome. Dans le noyau, la dissociation de la protéine chaperonne Hsp90 provoque l'exposition de la séquence d'exportation nucléaire. Le AhR et son ligand peuvent se complexer à ARNT et ainsi se lier à des éléments de réponse XRE. Toutefois, l'expression faible d'ARNT dans les cellules utilisées (Hepa-1) provoque rapidement la dissociation du complexe et l'exportation rapide du AhR suivie de sa dégradation dans le cytoplasme (Davarinos & Pollenz, 1999) : en l'absence de liaison à ARNT, le AhR est ainsi pris en charge par les récepteurs d'exportation comme Xpo1 (Exportin 1). Ce transporteur permet le relargage du AhR dans le cytoplasme où il subit une ubiquitinylation et est ensuite dégradé par le protéasome.

b) AhRR

Le AhRR a été identifié en 1999 par l'équipe du Pr. Fujii-Kuryama. Il partage de fortes homologies de séquence avec le AhR au niveau des domaines bHLH et PAS-A (Figure 12) et ainsi les fonctions de dimérisation avec ARNT et de liaison à l'ADN (Mimura et al., 1999). Toutefois, à l'inverse du AhR, il ne contient pas de domaine PAS-B et son domaine C-terminal ne comporte pas de séquence permettant le recrutement de co-activateurs et donc la transactivation (Figure 12).

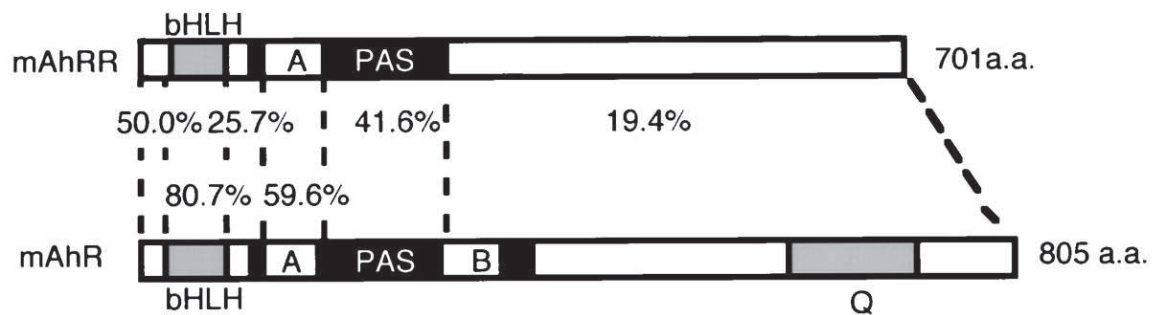


Figure 12: Représentation par domaines du AhRR et du AhR murin.

Les valeurs (%) représentent le pourcentage d'homologie entre les domaines des AhR et AhRR murins. Les domaines bHLH et PAS A sont très conservés entre les 2 protéines contrairement au domaine C-terminal qui présente seulement 19,4% d'homologie (Mimura et al., 1999).

Le AHRR (en l'absence de ligand) est capable de se complexer avec ARNT et de se lier aux XRE. Il rentre, ainsi, en compétition avec le AhR vis-à-vis d'ARNT (figure 13) mais il est incapable de lier les co-activateurs permettant l'initiation de la transcription des gènes cibles (Karchner et al., 2002). Cette protéine est exprimée constitutivement dans de nombreux tissus comme les testicules, les poumons, la rate, et le cœur chez les vertébrés. Son expression n'est pas forcément corrélée avec l'expression du AhR. Aucun homologue de cette protéine n'a été identifié chez les invertébrés (Hahn et al., 2009). Le gène murin du AhRR possède 4 XREs et, de ce fait, est induit par les agonistes du AhR (rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du AhR).

Le AhRR, en plus du mécanisme de compétition, peut agir selon un deuxième mécanisme de *transrepression* (Baba et al., 2001) (figure 13) : le AhRR seul ou complexé à ARNT, se lie au complexe AhR/ARNT et bloque ainsi la liaison des coactivateurs (Evans et al., 2008).

1) Compétition



2) Transrépression

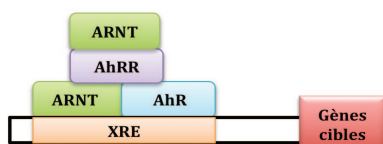


Figure 13: Mécanismes de répression de la protéine du AhR par le AhRR.

Le AhRR régule le AhR par 2 mécanismes : le premier mécanisme décrit est la compétition avec liaison de AhRR-ARNT en lieu et place du complexe AhR-ARNT sur les éléments de réponses aux xénobiotiques (XRE). Le deuxième mécanisme proposé est la transrépression via la formation d'un complexe à 4 protéines (AhR-ARNT/AhRR-ARNT). Adapté de (Hahn et al., 2009).

7. Modèles de souris transgéniques

Dans les années 1990, trois laboratoires ont produit indépendamment des souris transgéniques dont le gène AhR a été invalidé par recombinaison homologue (KO, « Knock-Out »). Dans le modèle de souris issu du laboratoire du Pr. Gonzalez, l'exon 1 a été remplacé par un gène de résistance à la néomycine et le site d'initiation de la traduction a été supprimé (Fernandez-Salguero et al., 1995). Le laboratoire du Pr. Bradfield, a choisi de remplacer l'exon 2 du AhR qui intervient dans la dimérisation avec ARNT, par le gène de résistance à la néomycine (Schmidt et al., 1996). Cette insertion entraîne un décalage de la phase de lecture et l'apparition d'un codon stop au sein de l'exon 3 du AhR. Un peptide de 23 acides aminés peut être ainsi synthétisé mais est supposé non fonctionnel. Un an plus tard, un dernier modèle a été publié par le laboratoire du Pr Fujii-Kuryama qui a remplacé l'exon 1 du AhR par le gène bactérien de la β -galactosidase couplé au signal de localisation nucléaire permettant à la fois d'invalider le AhR et de visualiser son expression tissulaire (par coloration) (Mimura et al., 1997). Toutes ces souris ont été créées à partir de cellules souches embryonnaires 129 et croisées avec des souris de fond génétique C57BL/6.

L'ensemble de ces modèles partage de nombreux points communs, comme une résistance aux effets toxiques de la dioxine, un retard de croissance, une diminution de la

taille du foie et une diminution de leur fertilité (Table 2). La réduction de la taille du foie observée chez les 3 modèles de souris KO est due à un défaut de fermeture d'une veine (*ductus venosus*) permettant le passage du sang ombilical vers la veine cave inférieure. Durant le développement normal, cette veine se ferme à la naissance, ce qui permet au sang oxygéné et riche en nutriments de passer à travers les sinusoides du foie. Chez les souris AhR^{-/-}, la *ductus venosus* reste ouverte ; le foie est alors privé d'une partie des nutriments ce qui limite sa croissance (Lahvis *et al.*, 2000, Lahvis *et al.*, 2005). Les souris ont également des défauts vasculaires au niveau des reins et des yeux (Lahvis *et al.*, 2000). En parallèle, une fibrose hépatique est observée. Le mécanisme proposé est une augmentation de la sécrétion du facteur pro-fibrotique, TGFβ (« Transforming growth factor »), par les fibroblastes (Corchero *et al.*, 2004).

La reproduction des souris KO est également altérée. En effet, les souris femelles AhR^{-/-} ont des défauts de conception et de lactation des souriceaux (Abbott *et al.*, 1999). Une diminution des follicules ovariens matures, provoquée par une synthèse insuffisante d'œstradiol a été observée chez ces femelles (Baba *et al.*, 2005). Les femelles ont également un défaut de développement de leurs glandes mammaires (Hushka *et al.*, 1998).

Cependant, ces modèles présentent également des phénotypes différents (Lahvis & Bradfield, 1998). Ainsi, les souris générées par le groupe du Pr. Gonzalez ont une mortalité néonatale d'environ 50% contrairement aux 2 autres modèles. Elles présentent des pathologies hépatiques (déplétion en glycogène, inflammation du canal biliaire, fibrose de la veine porte) qui ne sont pas observées chez les autres modèles ou avec un caractère moins sévère. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer une telle variabilité:

- La stratégie de recombinaison homologue
- Le choix du fond génétique (plusieurs souches de souris 129 existent pour générer les cellules ES)
- L'environnement et une éventuelle exposition à des agents infectieux

	AhRΔ1/Δ1Gonzalez	AhRΔ2/Δ2Bradfield	AhRΔ1/Δ1Fujii-Kuryama
Expression du AhR			
ARN	non présent	Présent- ARN tronqué (exon1-Exon3)	non présent
Protéine	nd	Pas détectable	nd
Phénotype des souris			
Léthalité néonatale	50%	Normale	Normale
Croissance (1 à 4 semaines)	Ralentie	Ralentie	nd
Fertilité	Diminution	Diminution	même que les WT
Taille du foie	Diminution de 50%	Diminution de 25%	nd
Présence de pathologies hépatiques (fibrose, ...)	oui	oui	nd
Défaut de fermeture de la <i>Ductus Venosus</i>	oui	oui	oui
Rate	nd	Augmentation de la taille	nd
Résistance aux effets toxiques de la dioxine	oui	oui	oui

Tableau 2 : Phénotypes observés chez les différentes souches de souris AhR^{-/-}.

WT : souris sauvage, nd : non déterminé (Adapté de(Esser, 2009).

En parallèle de ces modèles, un laboratoire a créé une lignée de souris où le AhR est constitutivement activé (CA). Pour cela, une portion du domaine de liaison du ligand (PAS-B) a été supprimée (souris CA-AhR) (Andersson et al., 2002). Les souris CA-AhR ont un phénotype semblable aux souris traitées par de la dioxine comme, par exemple, une diminution du poids du thymus et une augmentation de la taille du foie. De plus, leur espérance de vie est fortement diminuée. Ceci est corrélé avec l'apparition de tumeurs au niveau de l'estomac.

Afin d'étudier la localisation et l'expression temporelle du AhR transcriptionnellement actif, un modèle transgénique de souris appelé lacZ-XRE a été mis au point (Willey et al., 1998). Un transgène constitué de 2 XRE provenant du promoteur du CYP1A1 en amont d'un gène rapporteur LacZ a été introduit par transgénèse chez des souris. En présence d'un ligand tel que la TCDD, l'hétérodimère AhR/ARNT se fixe sur les éléments de réponse et induit la transcription du gène de la β-galactosidase, produisant ainsi une coloration après ajout de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactoside). Toutefois, les limites de ce modèle sont nombreuses. En effet, si le niveau d'expression du AhR ou d'un membre de sa voie de signalisation n'est pas suffisant, l'activité de la β-galactosidase sera trop faible pour être

détectée. De plus, ce système ne prend pas en compte la fixation de l'hétérodimère AhR/ARNT sur les éléments de réponse alternatifs évoqués plus haut (chapitre I.B.5.c).

8. Rôles physiologiques émergents du AhR

Le rôle du AhR dans la régulation du métabolisme des xénobiotiques a été largement étudié (voir les paragraphes précédents). Cependant, l'émergence des modèles de souris KO et l'identification de nouveaux gènes cibles (études transcriptomiques, (Diry et al., 2006)) ont permis de mettre à jour de nouvelles fonctions pour ce récepteur.

a) Rôle dans le système immunitaire

Les souris déficientes pour le AhR ne présentent pas d'altérations majeures du système immunitaire. Néanmoins, une diminution du nombre de lymphocytes dans la rate a été observé et, à l'inverse, une infiltration lymphocytaire dans certains tissus (poumons, intestins et tractus urinaire) dans le modèle de souris KO AhR^{1/Δ1Gonzalez} (Esser, 2009). Les souris générées par l'équipe du Dr. Gonzalez sont également plus sensibles à certains agents infectieux, dont *Helicobacter pylori*, suggérant une immunodéficiency dans ce modèle (Fernandez-Salguero et al., 1997).

Le AhR est exprimé dans un grand nombre de cellules immunitaires dont les cellules de Langherans et certains lymphocytes T (Esser, 2009). Dans le cas de l'immunité acquise, l'activation du AhR par ses ligands module la différenciation des cellules CD4⁺ de type Th17 (cellules T « helper » produisant des cytokines de type IL-17). Ce sous-type cellulaire est impliqué dans de nombreuses maladies auto-immunes. Au contraire, les cellules T régulatrices appelées Treg sont spécialisées dans la tolérance par rapport à des antigènes du soi et ont un effet antagoniste sur les Th17. Chez la souris, l'équilibre entre ces deux populations cellulaires est régulé en partie par le AhR et par la nature de son ligand (Quintana et al., 2008). En effet, le traitement par la TCDD d'un modèle de souris développant une encéphalomyélite auto-immune (EAE), provoque une amélioration du phénotype. Le mécanisme suspecté est l'augmentation du ratio Treg/Th17. Le traitement par un autre ligand du AhR, le FICZ (voir le paragraphe sur les ligands endogènes du AhR), entraîne l'effet inverse c'est-à-dire une aggravation des manifestations pathologiques, provoquée par l'augmentation de la population cellulaire Th17 (Veldhoen et al., 2008). Ces résultats montrent le rôle crucial du AhR et de ses ligands dans la différenciation des cellules Th17.

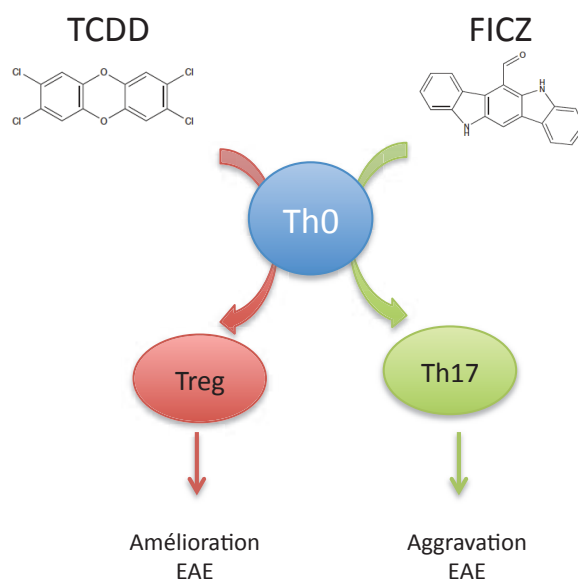


Figure 14 : Effet de différents ligands du AhR sur la différenciation des cellules Th0, précurseur des lymphocytes T « helper ».

EAE : « *Experimental autoimmune encephalomyelitis* »

Dans les cellules Th17, l'activation du AhR par le FICZ augmente également la production de l'IL-22, interleukine pro-inflammatoire impliquée dans de nombreuses pathologies dont le psoriasis et la maladie de Crohn (maladie inflammatoire chronique du côlon). Cette production d'IL-22 par les cellules Th17 est dépendante de la sécrétion d'une autre interleukine, l'IL-23 par les macrophages et les cellules dendritiques. Une étude montre que les cellules Th17 provenant de souris AhR^{-/-} sont incapables de produire l'IL-22 malgré la présence d'IL-23. Ces résultats suggèrent que l'activation du AhR, en fonction du type de ligand, régule l'auto-immunité induite par les cellules Th17 (Esser, 2009).

b) Rôle dans l'inflammation

Le AhR est clairement impliqué dans les phénomènes inflammatoires. Des études *in vitro* et *in vivo* montrent qu'un traitement par un ligand du AhR comme la TCDD, induit les gènes de l'inflammation, tels que ceux des cytokines pro-inflammatoires IL-6, RANTES et TNF α (Kim et al., 2012). En effet, des XRE ont été mis en évidence dans les promoteurs de ces gènes (Zhao et al., 2002).

En plus de cet effet direct par la voie classique transcriptionnelle, le AhR peut interagir avec plusieurs sous-unités du facteur NF- κ B et moduler ainsi son activité (Kim et al., 2000). Le facteur NF- κ B, facteur de transcription constitué de deux sous-unités parmi lesquelles on retrouve p50, RelA (p65), RelB (p52) et c-Rel, joue un rôle clé dans l'inflammation. L'effet du AhR peut être qualifié d'immuno-modulateur vis-à-vis de NF- κ B.

En effet, dans certains cas, le AhR inhibe l'activité de certaines sous-unités du complexe alors que dans d'autres cas, celle-ci est potentialisée. Ainsi, dans le modèle murin Hepa-1, le AhR interagit avec la sous-unité RelA diminuant, ainsi la fixation de NF- κ B sur ses éléments de réponse (Tian et al., 1999). Le AhR peut, également, se fixer sur la sous-unité RelB (Vogel et al., 2007). Le complexe transcriptionnel AhR/RelB se lie à des éléments de réponse spécifiques appelés RelBAhRE qui sont localisés notamment dans le promoteur du gène de l'interleukine IL-8.

L'effet différentiel de ligands du AhR évoqué dans le paragraphe sur l'immunité (chapitre I.B.8.a) est aussi communément retrouvé dans la régulation des phénomènes inflammatoires. Gary Perdew a ainsi mis en évidence que certains ligands du AhR possédaient un potentiel anti-inflammatoire (Benzo(a)pyrène). Dans ces études, un des marqueurs utilisés est la protéine Serum Amyloid A (SAA) impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation et dont l'expression diminue en présence de ces ligands. Certains ligands sAhRMs, dont le DiMNF (3',4'-dimethoxy- α -naphthoflavone), suppriment l'induction des gènes du complément produite par les cytokines pro-inflammatoires (Narayanan et al., 2012).

c) Rôle dans la migration

Le processus de migration cellulaire fait intervenir, entre autre, la redistribution des points d'adhérence focaux, complexes multiprotéiques comprenant des intégrines (ancrées à la matrice extracellulaire) et des protéines kinases (dont la FAK ou Focal Adhesion Kinase). Le traitement des cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 par la TCDD provoque un changement morphologique rapide (dès 1h) caractérisé par une redistribution des sites d'adhérence focaux (Tomkiewicz et al., 2012). La voie de signalisation activée dans ce cas précis, est celle de la kinase c-Src, partenaire du complexe cytoplasmique (chapitre I.B.5.a)). L'activation du AhR par son ligand provoque la libération de la protéine c-Src et, en conséquence, l'activation de FAK par phosphorylation. FAK est recrutée au niveau des « clusters » d'intégrines et provoque la dissociation des points d'adhérence focaux, ce qui enclenche le processus de migration cellulaire. En parallèle de ces mécanismes non génomiques, l'activation du AhR par la TCDD entraîne des événements transcriptionnels plus tardifs (4h après traitement) avec notamment l'augmentation de l'expression d'HEF1/CASL/NEDD9 (cible transcriptionnelle directe du AhR), protéine également impliquée dans la dynamique des points focaux ((Bui *et al.*, 2009) voir article en annexe).

En plus de cette étude impliquant un xénobiotique comme stimulus initial, le AhR semble réguler les phénomènes d'adhérence et de migration de manière intrinsèque : les

cellules fibroblastiques issues de souris AhR^{-/-} ont ainsi une activité migratoire réduite et forment moins de lamellipodes (Mulero-Navarro et al., 2005). Une étude complémentaire montre l'implication de VAV3, facteur d'échange de nucléotides identifié comme cible du AhR, dans ces processus (Carvajal-Gonzalez et al., 2009a). Toutefois, l'absence de AhR ne produit pas le même phénotype migratoire dans tous les modèles cellulaires. En effet, dans des kératinocytes, l'absence de AhR provoque une augmentation de leur migration et, par conséquent, l'accélération de la ré-épithélialisation de la peau due à une forte sécrétion de TGFβ (Carvajal-Gonzalez et al., 2009b).

Le processus migratoire est essentiel pour la plupart des tissus durant l'embryogenèse et notamment au niveau du système nerveux. Des défauts de migration des neurones et des cellules gliales peuvent entraîner de nombreuses maladies neurologiques dont certaines formes d'épilepsie, d'autisme ou encore de schizophrénie.

d) Rôle anti-œstrogénique/pro-œstrogénique

De nombreuses études ont montré que le AhR interagit avec des facteurs de transcription de la famille des récepteurs nucléaires. Le récepteur alpha aux œstrogènes (ou ERα) est un des partenaires d'interaction du AhR (Coumoul, 2007).

Dans de nombreuses conditions expérimentales, la TCDD a été décrite comme un agent anti-œstrogénique. A titre d'exemple, une étude menée sur des rats Sprague- Dawley montre que la dioxine diminue l'incidence des tumeurs mammaires en inhibant l'activation du récepteur aux œstrogènes (Holcomb & Safe, 1994). Ces études font écho au concept de sAhRM développé par le Dr Stephen Safe (chapitre I.B.5.c.1.c)). Le AhR et le récepteur aux œstrogènes alpha (ERα) peuvent interagir à différents niveaux:

- Régulation de la concentration circulante du ligand du ER, l'œstradiol. En effet, les gènes cibles du AhR induits par la TCDD comme par exemple le CYP1A1, le CYP1B1 et l'aromatase sont impliqués dans la formation (aromatase) et le catabolisme (CYPs) des hormones stéroïdiennes comme les œstrogènes.
- Augmentation de la dégradation du ERα par le protéasome par la formation d'un complexe AhR-ERα-CUL4B (E3 ubiquitin ligase) favorisant l'ubiquitylation du ERα.
- Compétition dans le recrutement de certains co-activateurs tels que CBP et p300

- Inhibition des gènes cibles du ER α (cathepsine D, pS2) par liaison du complexe AhR/ARNT sur des éléments de réponse inhibiteurs (appelé iXRE) (Krishnan et al., 1995).

Ces études suggèrent un rôle anti-œstrogénique du AhR et désigne la dioxine comme un antagoniste de l'activation du ER α . Cependant de récentes études montrent que les effets de la TCDD sont plus complexes et dépendent de la présence ou non d'œstrogènes. Le AhR peut ainsi exercer un rôle pro-œstrogénique en absence d'œstrogène, par liaison directe avec le ER α et activer la transcription de gènes œstrogéno-dépendants (Ohtake et al., 2003).

C. Le AhR chez les invertébrés

1. *Caenorhabditis elegans*

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'orthologue⁴ du AhR, nommé ahr-1 (« aryl hydrocarbon receptor related 1 »), partage 56% d'homologie de séquence avec le domaine bHLH du AhR murin et 35% avec son domaine PAS (Fujii-Kuriyama & Mimura, 2003). De plus, l'équipe du Pr. Powell-Coffman a identifié la protéine co-partenaire de ce récepteur, appelée aha-1 qui similairement à ARNT, se lie à de multiples protéines PAS comme le ahr-1 et les facteurs induits par l'hypoxie (Powell-Coffman et al., 1998). Des études menées *in vitro* dans des réticulocytes de lapin ont montré que le ahr-1 partage de nombreuses propriétés biochimiques avec son homologue murin. En effet, ahr-1 est capable de se complexer avec les protéines chaperonnes Hsp90 et également avec ARNT. Cependant, il est incapable de lier la TCDD et d'autres ligands exogènes (β -naphtoflavone) identifiés chez les mammifères (Butler *et al.*, 2001, Cespedes *et al.*, 2010). Ceci laisse sous-entendre que le ahr-1 pourrait être impliqué dans d'autres régulations que celles décrites chez les mammifères. De plus, ceci suggère que la réponse adaptative spécifique (métabolisme des xénobiotiques) décrite chez les mammifères est probablement absente chez les invertébrés (tout du moins qu'elle n'implique pas le ahr-1) et que celle-ci a été acquise au cours de l'évolution. Légitimement, ceci pose la question des fonctions endogènes chez les invertébrés : la construction d'un nématode mutant ahr-1 : GFP (« knock-in ») a permis de mettre en évidence la présence de ce récepteur pendant le développement embryonnaire et larvaire (Qin & Powell-Coffman, 2004). Au stade larvaire, 35 cellules expriment le ahr-1 : 5 cellules embryonnaires, deux cellules à corbeille

⁴ Deux gènes homologues de deux espèces différentes sont orthologues s'ils dérivent du même gène unique présent dans le dernier ancêtre commun aux deux espèces.

situées dans les phasmides⁵ et 28 neurones (interneurones, chémorécepteurs, neurones GABAergiques).

La création, par la même équipe, de nématodes dont la protéine a été mutée, a confirmé l'implication du *ahr-1* dans le développement neuronal. A titre d'exemple, *ahr-1* est essentiel pour le développement des motoneurones GABAergiques innervant les muscles de la tête du nématode (neurones RME pour « Ring Motoneuron ») (Figure 15) (Huang et al., 2004).

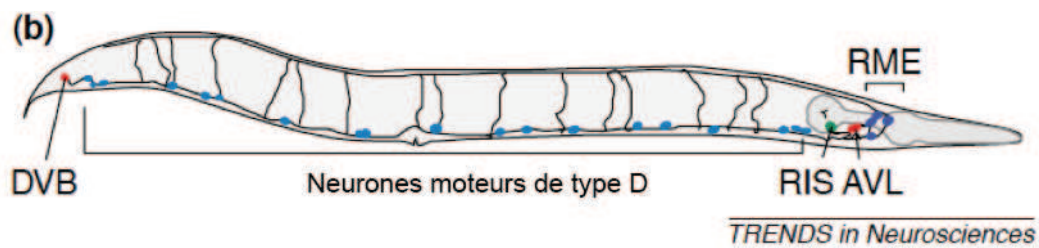


Figure 15 : Représentation schématique du système GABAergique du nématode *Caenorhabditis elegans*.

Les motoneurones GABAergiques de type D innervent les muscles du corps, les motoneurones AVL et DVB innervent les muscles entériques et le neurone RIS est un interneurone. Les motoneurones RME innervent les muscles de la tête, certains d'entre eux expriment le AhR et l'absence de ce dernier provoque un défaut de leur différenciation (Schuske et al., 2004)

Les 4 neurones RME se subdivisent en 2 lignées (gauche/droite ou dorsal/ventral) qui se différencient par leurs connexions dendritiques. Il a été montré que seuls les neurones RME du sous-groupe gauche/droite (RMEL, RMER ; L pour Left et R pour Right) exprimaient le *ahr-1*. Lorsque celui-ci est muté, ces neurones ont des défauts d'extensions synaptiques et d'expression de marqueurs spécifiques des neurones RMEL/R. Toutefois, la synthèse et le transport du GABA ne sont pas altérés. Les 2 neurones RMEL/R adoptent un phénotype dorso-ventral identique aux neurones RMED/V (D pour dorsal et V pour ventral). Le *ahr-1* joue ainsi un rôle dans le programme de différenciation des motoneurones RME. Les conséquences comportementales de ce défaut de différenciation n'ont pas encore été étudiées.

La perte du *ahr-1* entraîne également une suppression du comportement social d'alimentation des nématodes (Qin & Powell-Coffman, 2004). Ce comportement est régulé par divers facteurs environnementaux comme la concentration en oxygène et en nutriments. La sensibilité du ver aux variations en oxygène dépend de 4 neurones (AQR, PQR, URXR et

⁵ Les phasmides sont des organes chimiosensoriels pairs localisés au niveau de la partie postérieure du corps.

URXL). La réexpression du *ahr-1* dans ses 4 neurones est suffisante pour restaurer le comportement social d'alimentation des nématodes *ahr-1* mutants. Des gènes cibles du *ahr-1* ont été identifiés ; il s'agit de 2 guanylates cyclases solubles (*gcy35* et *gcy36*) et d'un récepteur natriurétique *npr1* (« natriuretic peptide receptor 1 »), impliqués dans la dépolarisation de neurones. Une étude plus récente, menée par l'équipe du Pr. Garry Wong, montre l'implication du *ahr-1* dans la biosynthèse des acides gras et plus particulièrement dans celle des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (Aarnio et al., 2010). La variation des concentrations de ce type d'acides gras est connue pour perturber la plasticité neuronale chez le nématode (Marza & Lesa, 2006).

2. *Drosophila melanogaster*

L'orthologue du AhR chez la *Drosophile melanogaster* est appelé Spineless (Ss). Cette protéine partage 71% d'homologie au niveau du domaine bHLH et 55% au niveau du domaine PAS-A du AhR murin mais seulement 17% avec le PAS-B qui est impliqué principalement dans la liaison du ligand (Figure 16) (Duncan et al., 1998).

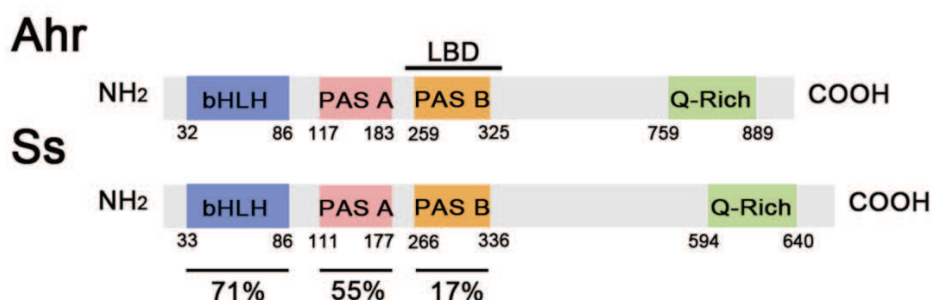


Figure 16: Structure du AhR murin et de Spineless.

Les pourcentages représentent les homologies de séquences entre le AhR murin et Spineless (Ss). LBD : « Ligand Binding Domain ». (Cespedes et al., 2010).

Spineless forme un hétérodimère avec une protéine partenaire nommée Tango chez la drosophile, et qui partage de fortes homologies de séquence avec ARNT. Des expériences de liaison ont démontré que Spineless, tout comme le *ahr-1*, ne peut lier les ligands exogènes des AhR de vertébrés comme la TCDD ou la β -naphtoflavone (Butler et al., 2001). Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence que le dimère Spineless/Tango, induit en absence de ligands exogènes, la transcription de gènes possédant un XRE (Emmons et al., 1999). Spineless est exprimé dans de nombreux tissus pendant le développement embryonnaire et larvaire mais plus particulièrement dans les segments maxillaires, labiaux et mandibulaires de la tête, au niveau des pattes, antennes et « soies » ainsi que dans le système nerveux

périphérique au niveau des segments thoraciques et abdominaux (Mcmillan & Bradfield, 2007b). Spineless est codé par un gène homéotique (qui influence la mise en place du plan d'organisation du corps chez la drosophile).

De nombreuses modifications de phénotypes sont observées chez les mutants Spineless et Tango (figure 17) :

- Transformation de la partie distale des antennes en partie distale de pattes
- Suppression des tarsi des pattes. Spineless est exprimé transitoirement dans la partie distale du segment T1 et du segment T2-T4 des pattes. Les mutants Spineless possèdent des pattes dont les parties T2-T4 sont supprimées.
- Défaut de développement des palpes maxillaires⁶
- Réduction de la taille des soies





Pattes		Palpe maxillaire	
Drosophile contrôle	Mutant Spineless	Drosophile contrôle	Mutants spineless
			

Figure 17 : Exemples de phénotypes observés chez les mutants Spineless (Emmons et al., 1999).

⁶ Petit appendice articulé des mâchoires de certains insectes, dont les drosophiles.

Spineless joue également un rôle essentiel dans la mise en place de la mosaïque rétinienne indispensable pour la vision des couleurs. En effet, les yeux des drosophiles sont constitués d'environ 800 ommatidies qui sont chacune constituée de 8 photorécepteurs. Les photorécepteurs de la couche externe (R1 à R6) sont similaires aux bâtonnets des vertébrés et les photorécepteurs de la couche interne (R7 et R8), qui expriment la rhodopsine (Rho), sont semblables aux cônes des vertébrés. Chez les drosophiles sauvages, les photorécepteurs R7 expriment de manière aléatoire soit la rhodopsine 3 (Rho3) soit la rhodopsine 4 (Rho4) alors que les photorécepteurs R8 expriment soit la rhodopsine 5 (Rho5) soit la rhodopsine 6 (Rho6). Cette mosaïque ainsi créée permet de détecter un large spectre de longueurs d'onde. Le couple Rho4/Rho6 (R8), qui est majoritaire dans les ommatidies (environ 70%), permet la reconnaissance des longueurs d'onde longues (ces ommatidies apparaissent jaunes lorsqu'on les illumine avec de la lumière blanche). Le couple Rho3/Rho5 (R7) permet la reconnaissance de courtes longueurs d'onde (ces ommatidies apparaissent « pâles » lorsqu'on les illumine avec de la lumière blanche). Chez les mutants Spineless, bien qu'aucun changement morphologique n'ait été détecté au niveau des ommatidies, celles-ci expriment exclusivement des photorécepteurs avec le couple Rho3/5 (R7). L'expression ectopique de Spineless provoque l'expression du couple Rho4/6 (R8) dans 100% des ommatidies (Figure 18) (Wernet et al., 2006).

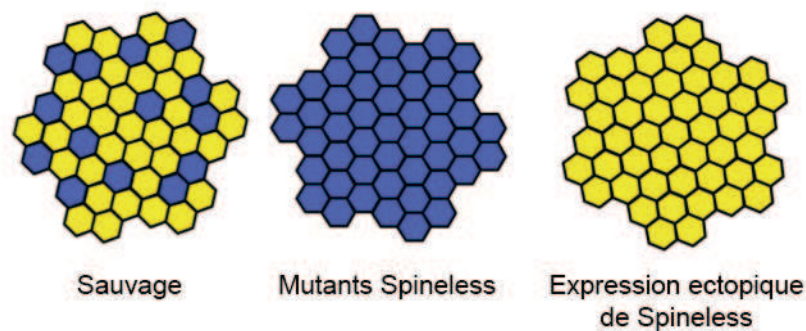


Figure 18: Cartographie et phénotype associé des photorécepteurs des ommatidies chez les différents mutants Spineless.

Chez les drosophiles sauvages, les yeux sont constitués d'une mosaïque d'ommatidies exprimant des photorécepteurs différents permettant la vision en couleur. Chez les mutants Spineless, les ommatidies expriment toutes les mêmes photorécepteurs qui reconnaissent les courtes longueurs d'ondes (ommatidies pâles) alors que l'expression ectopique de Spineless provoque l'expression des photorécepteurs reconnaissant les longueurs d'onde longues (ommatidies jaunes) (Mcmillan & Bradfield, 2007b).

Tout comme *ahr-1* chez le nématode, *Spineless* a été identifié comme un régulateur du développement neuronal et de la différenciation dendritique. Une étude montre son rôle dans la régulation de l'arborisation dendritique des neurones sensoriels (Kim et al., 2006). Les neurones sensoriels peuvent être classés en quatre groupes selon la morphologie de leurs dendrites. La suppression de *Spineless* provoque un changement de morphologie de l'arborisation dendritique de plusieurs sous-types neuronaux. On observe une augmentation des branchements dendritiques dans les classes de neurones qui ont une arborisation très « simple » (neurones sensoriels de classe I), et inversement, on observe une réduction des branchements dendritiques au niveau des neurones qui ont une arborisation très complexe (neurones sensoriels de classe IV) (Figure 19). *Spineless* est également nécessaire à la diversité dendritique retrouvée chez les différentes classes de neurones sensoriels (Kim et al., 2006).

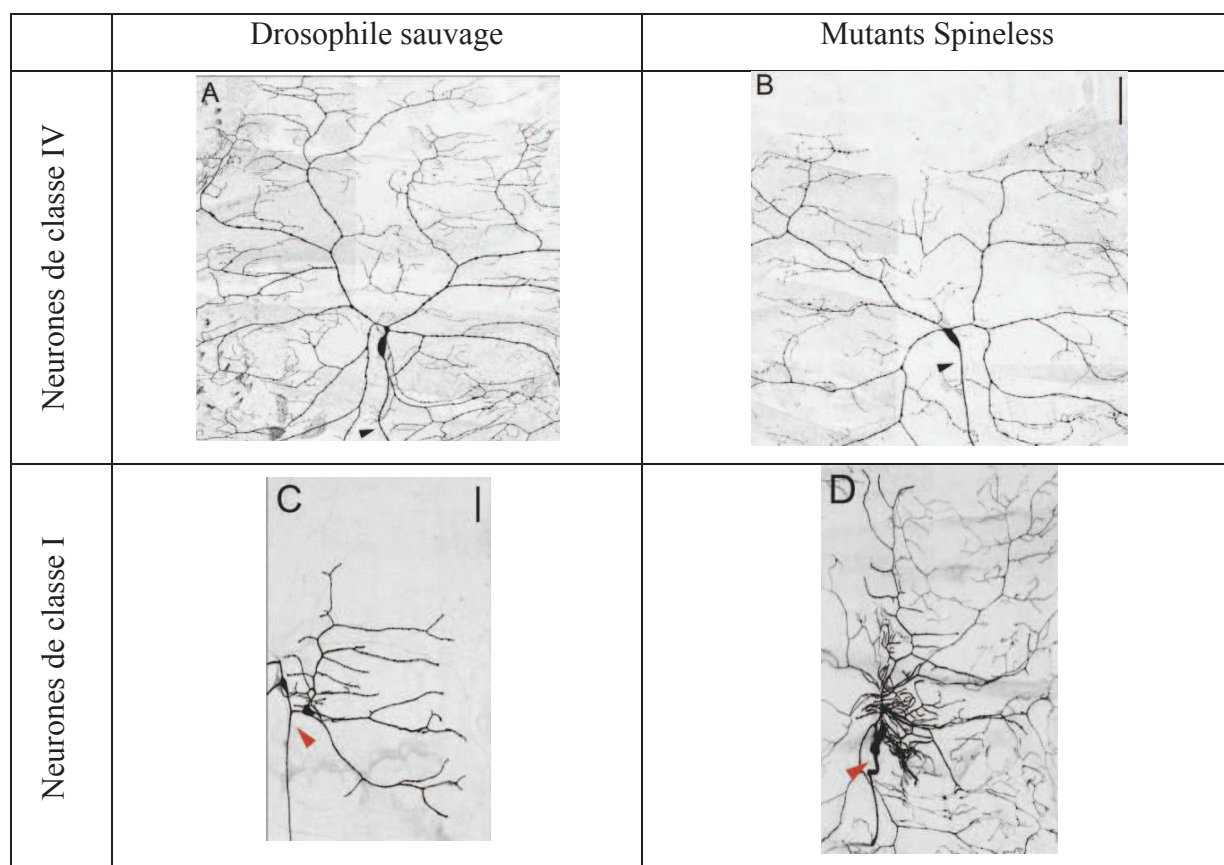


Figure 19: Arborisation dendritique de 2 types de neurones sensoriels chez des drosophiles sauvages et mutantes *Spineless*.

A et B représentent des neurones de classe IV. Une réduction des branchements terminaux chez les mutants spineless, est observée (B). C et D représentent des neurones de classe I. Les mutants spineless (D) présentent une augmentation de la croissance de la branche principale et des branchements terminaux (Kim et al., 2006).

Récemment, une équipe a inséré le AhR murin sous le contrôle d'un promoteur inductible dans des drosophiles mutantes pour Spineless (Cespedes et al., 2010). Ils ont montré qu'en absence de dioxine, le AhR murin était capable de remplacer la fonction de Spineless chez la drosophile avec:

- Une restauration presque complète du phénotype lié à la perte de fonction de Spineless durant le développement.
- Une localisation du AhR murin dans le noyau comme son homologue invertébré.
- Une liaison à la protéine co-partenaire Tango.

Ce travail suggère que le AhR a conservé ses fonctions ancestrales durant l'évolution. Ainsi, tout comme Spineless ou ahr-1, le AhR murin pourrait jouer un rôle important dans le développement et l'homéostasie du système nerveux.

II. Le AhR et le système nerveux des mammifères

A. Localisation du AhR dans le système nerveux

Plusieurs études ont été réalisées afin d'étudier la localisation du AhR durant le développement du système nerveux. Cependant, les résultats publiés sont très contradictoires.

L'équipe du Dr. B.D. Abbott a étudié, par hybridation *in situ*, l'expression de l'ARNm durant le développement embryonnaire (de 10 à 16 jours de gestation) de **souris C57BL/6N**. Cette étude montre que le AhR est exprimé dès le 10^{ème} jour de gestation dans le neuroépithélium et dans le ganglion trigéminal⁷ (au niveau de la branche ophtalmique et mandibulaire), sa localisation cellulaire étant majoritairement nucléaire (Figure 20 à gauche). L'expression de la **protéine AhR** décroît graduellement dans ces tissus jusqu'au jour 14 de gestation et devient détectable dans certaines régions spécifiques du cerveau dont l'hippocampe¹ (Abbott et al., 1995). Le AhR est également présent dans le système nerveux périphérique au niveau des ganglions rachidiens à partir du jour 12 de gestation, et dans le cristallin et la rétine au jour 13.

L'équipe du Dr. C.A. Bradfield a étudié en parallèle l'expression du AhR durant le développement embryonnaire également par hybridation *in situ* du jour 9,5 au jour 16 de gestation chez les **souris C57BL/6J** (Jain et al., 1998). Leur étude montre que l'ARNm du AhR n'est pas exprimé (ou est du moins indétectable) au jour 9,5 de gestation. Au 13^{ème} jour de gestation, le AhR est exprimé dans de nombreuses régions comme le thymus ou les poumons. Toutefois, aucune expression au niveau du système nerveux n'a été identifiée (Figure 20 à droite). Ces deux études utilisent des ribosondes marquées au ³⁵S. Cette technique de marquage des sondes présente comme inconvénient d'induire des faux-positifs. Concernant la caractérisation de l'expression de la protéine (Abbott et al., 1995), la problématique posée par la qualité des anticorps sera évoquée plus loin, page 45.

⁷ Le ganglion trigéminal est le ganglion sensitif du nerf trijumeau (nerf cranien V) qui se divise en trois branches : la branche maxillaire, la branche mandibulaire et la branche ophtalmique.

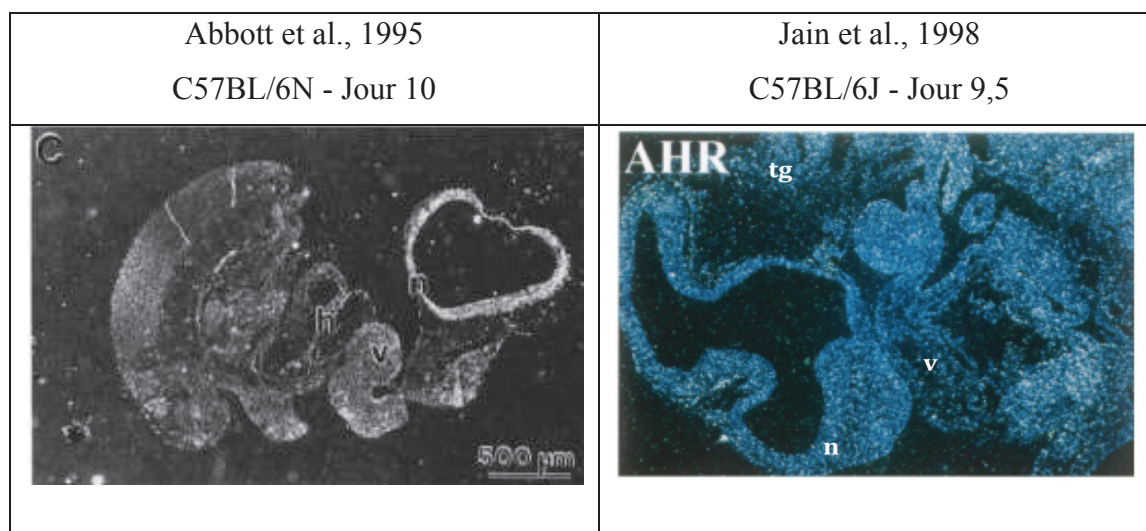


Figure 20 : Localisation de l'ARNm du AhR durant le développement embryonnaire chez la souris.

Hybridation in situ du AhR dans les embryons de souris C56BL/6

Colonne de gauche : n : neuroépithélium, h : cœur, v : arcs viscéraux, tp : placode trigéminal. Les grains blancs représentent le signal d'hybridation (Abbott, 1995)

Colonne de droite : n : neuroépithélium, tg : ganglion trigéminal, v : ventricule cardiaque. Les grains blancs représentent le signal d'hybridation, les noyaux des cellules sont colorés en bleu (DAPI) (Jain, 1998).

Par la suite, de nouvelles expériences d'hybridation *in situ* ont été effectuées sur un autre modèle, le **rat Sprague-Dawley** en utilisant des ribosondes marquées au ^{32}P qui ont pour avantage de permettre une plus grande sensibilité de la détection (Petersen et al., 2000). Cette étude montre que, **chez l'adulte**, l'ARNm du AhR est exprimé dans de nombreuses régions cérébrales avec cependant des niveaux d'expression différents. Par exemple, le AhR est exprimé dans la couche CA3 de l'hippocampe, dans les cellules granulaires du cervelet ainsi que dans l'olive inférieure, alors que son expression est indétectable dans les noyaux pré-optiques de l'hypothalamus ce que contredit une étude postérieure de 2002, démontrant, par hybridation *in situ*, que le AhR est exprimé au niveau de ces mêmes noyaux pré-optiques chez le **rat Sprague-Dawley adulte** (Hays et al., 2002). Dans cet article, les sondes AhR ont été marquées au ^{33}P .

En parallèle de ces expériences d'hybridation *in situ*, plusieurs articles ont caractérisé l'expression de **la protéine AhR** dans différentes régions du cerveau. L'équipe du Dr. Abbott a montré son expression chez l'embryon de souris **C57BL/6N** en développement dans les mêmes régions que l'ARNm, dont l'hippocampe (Abbott et al., 1995). Chez les **souris C57BL/6J**, le AhR semble être exprimé dans le cervelet à différents âges (P0, P3, P6, P10, P21 et chez les adultes) (Williamson et al., 2005). Des cultures primaires permettent de montrer son expression plus spécifiquement dans les cellules granulaires du cervelet

(Sanchez-Martin et al., 2011). Une étude plus étendue montre que la *pars compacta* de la substance noire⁸, et différentes régions de l'hippocampe (le gyrus denté et les parties CA1 et CA3 de la corne d'Ammon) expriment ce récepteur (Akahoshi et al., 2009). Des expériences de Western blot ont également été réalisées sur des homogénats de cultures primaires de neurones corticaux et d'astrocytes de rats Sprague-Dawley et montrent l'expression du AhR dans ces régions (Lin et al., 2008).

Toutes ces études indiquent que la protéine du AhR est exprimée dans différentes zones du cerveau mais elles se révèlent extrêmement hétérogènes dans leurs conclusions. Une explication rationnelle à cette hétérogénéité est que les marquages révélés dans ces articles ont été uniquement réalisés sur des tissus de souris exprimant le AhR et n'ont pas utilisé comme contrôle négatif, des tissus issus de modèles de souris AhR KO. Nous avons tenté de reproduire ces protocoles sur des tissus fixés de souris AhR KO. Le résultat révèle un marquage identique à celui observé avec des tissus de souris sauvages. Les protocoles (notamment les anticorps utilisés) sont donc probablement non spécifiques, ce qui invaliderait les conclusions de ces études. Des résultats similaires ont été trouvés par d'autres équipes (rencontrées lors de différents symposiums dont le « AhR symposium à Dusseldorf en 2011 ») qui ont également utilisé les souris AhR KO comme contrôle négatif.

⁸ *Pars compacta* : partie de la substance noire constituée de neurones dopaminergiques, impliquée dans les systèmes de récompense, d'addiction et dans la motricité.

B. Rôles du AhR dans le système nerveux des mammifères : Effets d'un ligand exogène : la TCDD

1. Etudes comportementales

Les équipes de recherche se sont essentiellement concentrées sur les effets d'un ligand exogène du AhR, la TCDD (très utilisée du fait de sa spécificité mécanistique) au cours du développement et sur l'homéostasie du système nerveux. De plus, ce polluant environnemental s'accumule dans l'organisme au niveau des tissus gras comme, le cerveau (Kakeyama & Tohyama, 2003) durant une dizaine de jours chez la souris. Son caractère lipophile lui permet de passer les barrières hémato-encéphalique et placentaire. De plus, diverses études épidémiologiques chez l'Homme et expérimentales chez l'animal montrent que la TCDD possède de nombreux effets neurotoxiques (Birnbaum & Tuomisto, 2000) :

Des **études épidémiologiques** suggèrent que des enfants exposés accidentellement à un mélange de polychlorobiphényles ou PCBs (PCB 126+PCB156 tous deux ligands du AhR) et de dioxines souffrent d'un retard de développement moteur et d'une hypotonie⁹ (Neuberger *et al.*, 1999, Rogan & Gladen, 1992). Chez l'Homme, des observations récentes montrent également que la circonférence de la tête du nouveau-né, un indicateur du développement cérébral fœtal, est corrélée négativement avec la quantité de TCDD retrouvée dans le lait maternel (Nishijo *et al.*, 2008, Tawara *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent qu'une exposition à la TCDD a un effet sur la maturation du cerveau et est un facteur de risque d'anomalies du développement cérébral.

Les **études comportementales** réalisées chez l'animal après une exposition à la TCDD durant le développement, révèlent i) des défauts de coordination motrice chez des rats Wistar (diminution de leur habilité à rester sur le Rotarod¹⁰) (Thiel *et al.*, 1994) ii) une altération de la mémoire spatiale de rats Sprague-Dawley dans le test du labyrinthe radial à 8 branches¹¹ (Seo *et al.*, 1999) iii) une perturbation de la motricité sur le test du plan incliné¹² chez de jeunes rats Wistar (Nishijo *et al.*, 2007).

⁹ L'hypotonie est un manque de tonus musculaire

¹⁰ Le **rotarod** est un appareil permettant de mesurer l'apprentissage et la coordination motrice. Il consiste à mesurer le temps de maintien d'un animal disposé sur une barre cylindrique tournant à une vitesse définie.

¹¹ Le **labyrinthe à 8 branches** est utilisé pour étudier l'apprentissage et la mémoire spatiale. Il est constitué de 8 bras équidistants et d'une plateforme circulaire centrale.

¹² Le **plan incliné** permet de déterminer l'angle critique jusqu'auquel l'animal est capable de s'agripper sur une surface rugueuse, afin de mesurer sa force musculaire et sa coordination.

La plupart des effets toxiques de la TCDD passe par son récepteur, le AhR. Les cibles et les mécanismes à l'origine de ces altérations phénotypiques ont fait l'objet de nombreuses études présentées ci-dessous.

2. Etudes des mécanismes neurotoxiques de la TCDD

La TCDD peut agir sur les différentes populations cellulaires du système nerveux central (SNC) présentées dans la figure 21.

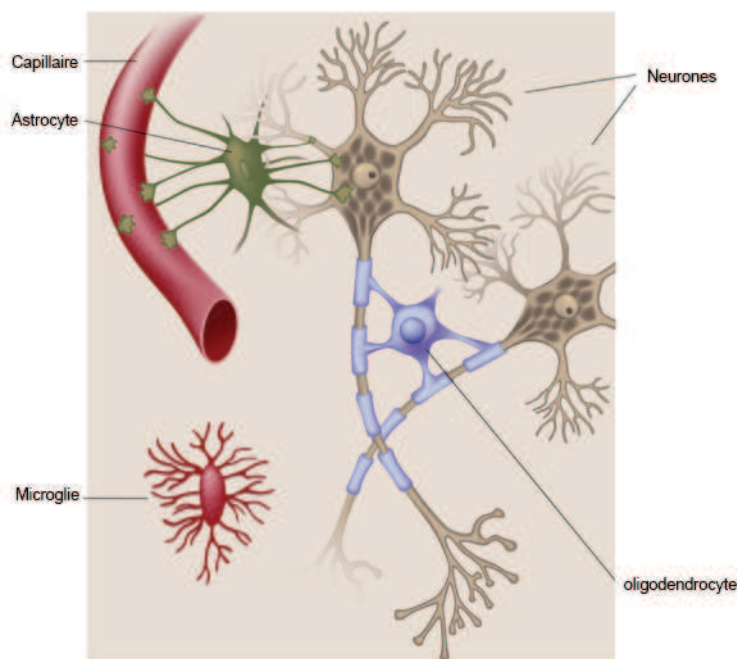


Figure 21 : Représentation schématique des différentes populations cellulaires du système nerveux central.

Dans le système nerveux central, les neurones sont entourés de cellules de la glie. Les cellules de la microglie sont des cellules du système immunitaire, mobilisées lors de lésions ou d'infections. Les astrocytes jouent, entre autre, un rôle dans l'apport en nutriments aux neurones et le maintien de la balance ionique du milieu extracellulaire. Les oligodendrocytes sont des cellules myélinisantes. Dans le système nerveux périphérique, les cellules myélinisantes sont les cellules de Schwann. (Adapté de <http://fr.fotolia.com/id/30755393>)

a) Action sur les oligodendrocytes

Récemment, une équipe a étudié les effets d'une exposition à la dioxine pendant la gestation sur la myélinisation du SNC (Fernandez et al., 2010). L'administration d'une unique dose de TCDD (0,7 µg/kg) à des rates Agouti noires au jour 18 de gestation provoque chez les jeunes rats (P2/3, P14, P30 et P135) une modification de l'expression de différents marqueurs dans le cervelet :

- Augmentation de Olig1 (« oligodendrocyte transcription factor 1 »), marqueur des cellules précurseurs indifférenciées de la lignée oligodendrocytaire (P14 à P135)
- Augmentation de PDGFR α (« platelet derived growth factor receptor, alpha »), marqueur des oligodendrocytes en prolifération et non myélinisants (P2/3 et P14)
- Diminution de la MBP (« Myelin Basic Protein »), marqueur des oligodendrocytes myélinisants (P135)

La TCDD induirait, ainsi, un retard de différenciation et de maturation des oligodendrocytes. Deux mécanismes sont suspectés : le premier est un effet direct de la TCDD *via* le AhR durant la période critique de prolifération, migration et maturation des précurseurs des oligodendrocytes. Le second mécanisme proposé est un effet indirect de la dioxine sur les hormones endocrines (ex : œstrogènes et hormones thyroïdiennes) dont l'équilibre est important pour la maturation des oligodendrocytes.

b) Action sur les astrocytes

Afin d'étudier les effets de la dioxine sur les astrocytes, une équipe a travaillé sur un modèle de cellules gliales de rat, C6. Ces cellules ont la capacité, en présence de dbAMPc (« dibutyryl AMP cyclic »), de se différencier en astrocytes (différenciation morphologique et expression du marqueur GFAP pour « glial fibrillary acidic protein »). Le co-traitement des cellules par de faibles doses de TCDD (1 nM) et du dbAMPc entraîne une réduction de la longueur des ramifications des astrocytes et une diminution de l'expression de la GFAP. L'utilisation d'un antagoniste du AhR (α -naphthoflavone) a permis de mettre en évidence l'implication de ce récepteur dans ces processus (Takanaga et al., 2001). La TCDD modifie également l'homéostasie calcique dans des cultures d'astrocytes de rats (Legare et al., 1997).

c) Action sur les neurones

(1) Effets toxiques sur les précurseurs neuronaux

Une étude de l'expression globale des gènes (transcriptomique) dans le télencéphale¹³ de souris exposées à la TCDD durant leur développement a été entreprise (Gohlke et al., 2009). Les télencéphales ventraux et dorsaux ont été disséqués au jour 13,5 de gestation après 48 heures de traitement (5 μ g/kg *per os*). La région ventrale du télencéphale contient de

¹³ Chez l'embryon, le télencéphale est la vésicule antérieure à l'origine des hémisphères cérébraux, des lobes olfactifs et des corps striés.

nombreux neurones GABAergiques alors que la région dorsale contient majoritairement des neurones glutamatergiques. Aucune différence dans la morphologie du télencéphale n'a été observée entre les souris traitées et non traitées. Toutefois, de nombreux gènes ont une expression modifiée par le traitement (environ 400 gènes). L'analyse de ces gènes suggère que la TCDD pourrait altérer la neurogenèse en prolongeant l'activation de gènes de la voie Notch, impliqués dans l'inhibition de la différenciation neuronale, comme par exemple *Hes1* (« hairy and enhancer of split homolog 1 »). Ce répresseur transcriptionnel a déjà été décrit comme une cible de la TCDD dans un modèle de carcinome mammaire humain (Thomsen et al., 2004). L'expression de gènes favorisant la différenciation neuronale tels que *Mash1* et les homéoprotéines *Dlx1* et *Dlx2* ou *Sox11*, est diminuée après traitement par la dioxine (Gohlke et al., 2009). Cette étude a été réalisée sur des homogénats de télencéphales constitués de cellules souches neuronales pouvant se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Une exposition à la TCDD pourrait ainsi entraîner une neurotoxicité sur le cerveau en développement.

D'autres auteurs se sont plus spécifiquement intéressés aux précurseurs neuronaux, ainsi et bien que ces résultats soient désormais contestés (voir paragraphe II a), l'expression du AhR a été mise en évidence dans le cervelet de souris par Western Blot durant les premiers jours suivant la naissance et jusqu'à l'âge adulte. Le pic d'expression du AhR se situe entre les jours 3 et 10 après la naissance, ce qui correspond à une période critique pour le développement des cellules granulaires (Williamson et al., 2005). Durant l'embryogenèse, les précurseurs des cellules granulaires (GNP), originaires des lèvres rhombiques du métencéphale, migrent dans la couche granulaire externe (EGL) où ils prolifèrent rapidement (figure 22). A partir de la naissance et jusqu'au jour 18 post-natal, les cellules granulaires post-mitotiques subissent une migration tangentielle (c'est-à-dire parallèle à la surface du cervelet) et se différencient en émettant deux prolongements en direction opposée (futurs axones appelés fibres parallèles). C'est au cours de cette période critique que le AhR s'exprime (P3-P10). Du jour 7 au jour 21, les cellules granulaires émettent un troisième prolongement perpendiculaire à la surface qui leur permet de migrer le long des cellules de Bergmann (BG sur le schéma). Ces cellules spécialisées de la glie assurent la migration radiaire des grains jusqu'à la couche granulaire interne (IGL) (Figure 22). Dans la couche IGL, les cellules granulaires sont différenciées et expriment des marqueurs spécifiques comme le récepteur GABA(A) α 6.

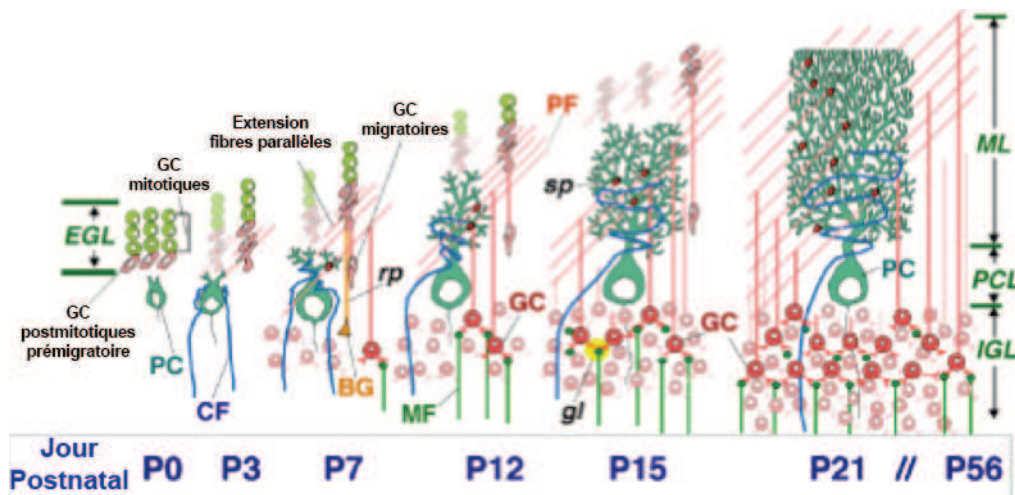


Figure 22 : Représentation schématique du développement du cervelet.

EGL : couche granulaire externe, GC : cellules granulaires, PC : cellules de Purkinje, BG : cellules Bergmann, MF : fibres moussues, CF : fibres grimpantes, PF : fibres parallèles, ML : couche moléculaire, PCL : couche des cellules de Purkinje, IGL : couche granulaire interne, rp : fibres radiaires des cellules de Bergmann (Adapté de <http://www.cdtdb.neuroinf.jp/CDT/About.jsp>)

Le traitement par la TCDD de souris transgéniques lacZ-XRE, âgées de 10 jours, (Willey et al., 1998) a permis de montrer une activité du AhR (*via* l'activation de la β -galactosidase) dans la couche externe des cellules granulaires et dans la couche moléculaire du cervelet (Williamson et al., 2005).

Des études *in vivo* et *in vitro* (cultures primaires de précurseurs de cellules granulaires) ont mis en évidence différents effets de la TCDD sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules granulaires :

- **Effets sur la prolifération**

Après une exposition à la TCDD (1 $\mu\text{g/kg}$, *per os*) de souris C57BL/6J âgées de 6 jours, une augmentation de l'épaisseur de la couche granulaire externe (EGL) ainsi que de l'expression de la protéine pH3, facteur assurant le passage G2/M du cycle cellulaire, sont observées. Ceci suggère une augmentation de la prolifération cellulaire des cellules granulaires mitotiques (voir mitotic GC entre P3-P7 sur la figure 22) (Collins et al., 2008). Ces effets pro-prolifératifs sur les cellules granulaires ne sont pas nécessairement retrouvés avec tous les types cellulaires neuronaux : ainsi, la TCDD diminue la prolifération (arrêt du cycle en phase G1) de :

- la lignée C17.2, lignée immortalisée dérivant de précurseurs neuronaux de cervelet de souris

- des précurseurs NPC (« neural precursor cells ») primaires provenant du prosencéphale de souris ou de précurseurs neuronaux (Latchney et al., 2011). L'expression du AhR *in vivo*, durant la période de prolifération des NPC (Abbott et al., 1995), pourrait être à l'origine d'une plus grande susceptibilité à la toxicité des ligands du AhR durant le développement embryonnaire.

- **Effets sur la différenciation**

La même étude *in vivo* montre que la TCDD augmente des marqueurs précoces de la différenciation des cellules granulaires comme TAG1 (ou Contactin2). De plus, le traitement de cultures de cellules granulaires par 10 nM de TCDD provoque une augmentation de la croissance neuritique 8h après traitement. Ils observent également après 3 jours de traitement une augmentation de l'expression de PSA-NCAM (« PolySialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecule ») et du récepteur GABA(A) α 6, protéines exprimées dans les cellules granulaires matures (Collins et al., 2008). Ces résultats suggèrent que la TCDD stimule la différenciation des précurseurs des cellules granulaires à un stade précoce de leur maturation. Si ce phénomène se produit trop précocement, la mise en place de certaines couches cérébelleuses pourrait être affectée.

- **Effets sur l'apoptose**

Durant le développement du cervelet, deux vagues d'apoptose ont lieu : une première dans la couche EGL au 10^{ème} jour après la naissance, et une seconde moins importante dans la couche IGL au 21^{ème} jour (White & Barone, 2001). La TCDD entraîne l'augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX (« BCL2-associated X protein ») dans la couche moléculaire et dans la couche IGL chez les souris âgées de 10 jours, deux zones dans lesquelles l'apoptose est absente chez les souris non traitées. Une augmentation de l'apoptose a été également observée sur des cultures primaires de cellules granulaires traitées par de la TCDD (fragmentation de l'ADN et augmentation de l'activité de la caspase-3) (Sanchez-Martin et al., 2011). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) a été détectée dans ces cultures. L'utilisation simultanée de cultures primaires de cellules granulaires issues de souris KO, a permis de mettre en évidence le rôle du AhR dans ce phénomène.

(2) Effets toxiques sur les neurones différenciés

L'un des effets neurotoxiques classiquement associé à l'exposition de polluants (pesticides organochlorés, paraquat, roténone par exemple dans la maladie de Parkinson) est l'activation de certaines voies apoptotiques. Dans ce contexte, l'une des hypothèses retenue est celle d'une apoptose dépendante d'une excitotoxicité glutamatergique, elle-même dépendante de l'activité des récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique): ceux-ci sont des canaux tétramériques, constitués de deux sous-unités NR1 et de deux sous-unités NR2 perméables au calcium. Ils jouent un rôle important dans la survie et la plasticité synaptique *via* l'induction du facteur BDNF (« brain-derived neurotrophic factor ») mais induisent également une excitotoxicité du fait d'un grand influx de calcium en cas de stimulation prolongée. Les effets bénéfiques ou toxiques des récepteurs NMDA sont attribués à leur localisation membranaire au niveau de sites synaptiques ou extrasynaptiques (Hardingham & Bading, 2010). Le traitement par de faibles doses de NMDA stimule préférentiellement les récepteurs synaptiques et la survie neuronale en induisant la voie de signalisation CREB (« cAMP-responsive element binding protein ») qui augmente l'expression de BDNF. Au contraire, de fortes doses de NMDA activent à la fois les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques (ces derniers ayant un effet antagoniste sur les récepteurs synaptiques avec une diminution associée de l'induction du BDNF), ce qui provoque un trop grand influx de calcium et la mort cellulaire : le traitement des neurones corticaux par de fortes doses de NMDA induit une excitotoxicité qui se traduit par une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et l'apoptose des cellules (Vanhoutte & Bading, 2003).

Un traitement par la TCDD de cultures primaires d'hippocampe de rat provoque une élévation rapide de la concentration intracellulaire de calcium ($[Ca^{2+}]_i$) (Hanneman et al., 1996) qui est associée avec une diminution du potentiel de membrane mitochondriale (ce qui suggère la mise en place d'une réponse apoptotique) et à l'activation des protéines kinases, α -PKC et ϵ -PKC.

Une autre étude a rapporté le même phénomène et a démontré l'implication des récepteurs NMDA dans cette élévation de Ca^{2+} intracellulaire. Le blocage de ces récepteurs dans les neurones granulaires du cervelet, abolit l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ mais aussi la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) provoquée par la TCDD (Kim & Yang, 2005). D'autres auteurs ont identifié les mécanismes cellulaires associés : l'élévation la concentration de calcium active la protéine kinase CaMK-IV (« Calcium/calmodulin dependent protein kinase IV ») qui subit alors une translocation nucléaire et phosphoryle le

co-activateur CBP (« CREB binding protein ») qui intervient dans la voie de signalisation du AhR. Ceci a pour conséquence l'augmentation de la transcription du gène du Cyp1a1 et par conséquent l'augmentation des niveaux d'ERO¹⁴. Les ERO peuvent être très toxiques en cas d'élévation trop importante de leur production, et conduire à la mort neuronale (Lin et al., 2008). Enfin, une étude plus récente menée par la même équipe montre que la TCDD, *via* le AhR, augmente l'expression de la sous-unité NR2A du récepteur NMDA, ce qui renforcerait le potentiel d'excitotoxicité (Lin et al., 2008). Une synthèse de l'ensemble de ces résultats est présentée en figure 23. De plus, un traitement périnatal (15^{ème} jour de gestation) de rate provoque une diminution de l'ARNm de la sous-unité NR2B et l'augmentation de l'ARNm de la sous-unité NR2A (Kakeyama et al., 2001).

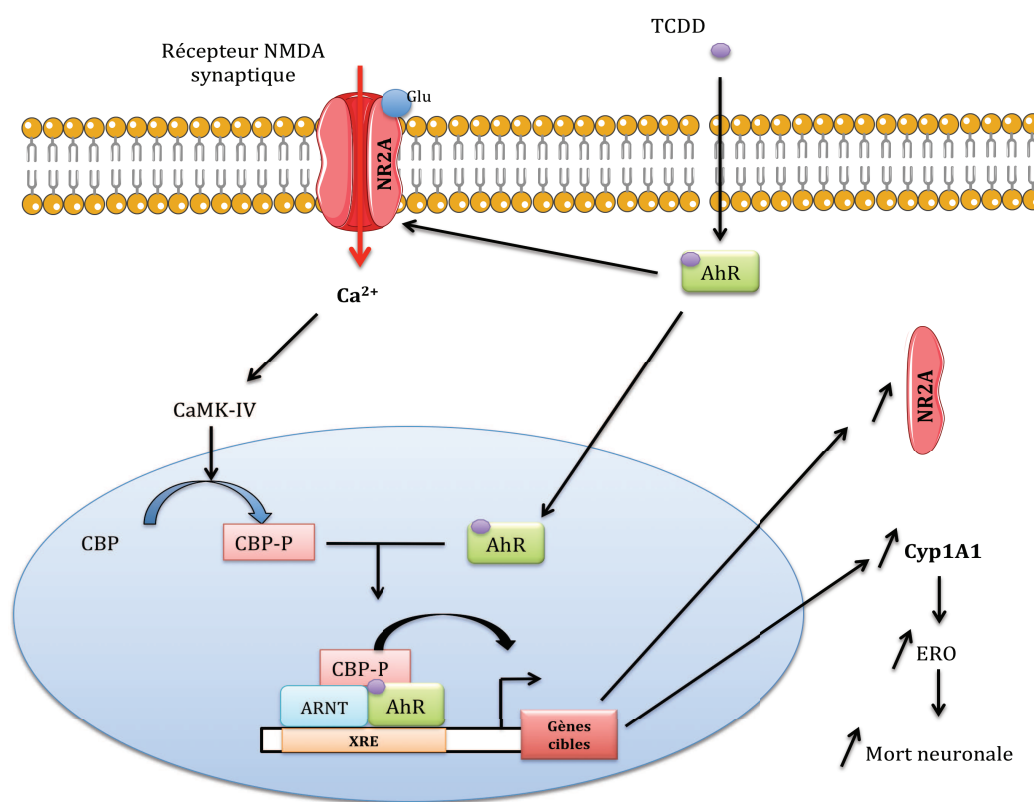


Figure 23 : Représentation schématique des mécanismes de neurotoxicité de la TCDD dépendant du calcium.

L'activation du AhR par la TCDD entraîne sa translocation nucléaire et sa liaison avec son partenaire ARNT. L'hétérodimère formé recrute le coactivateur CBP phosphorylé et active la transcription de gènes cibles dont la sous-unité NR2A du récepteur NMDA et le Cyp1A1 qui produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO) pouvant provoquer la mort neuronale. Cette voie de signalisation impliquant le AhR favorise ainsi une entrée de calcium dans la cellule à travers les récepteurs NMDA, qui active l'enzyme CaMK-IV qui phosphoryle le coactivateur CBP. Adapté de (Lin et al., 2008).

¹⁴ L'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par le Cyp1A1 est due au découplage vis à vis de l'oxygène, observé avec certains de ses substrats.

(3) Effets sur la sécrétion de neurotransmetteurs

D'autres mécanismes de cytotoxicité neuronale ont été décrits comme étant associés à la présence de ligands du AhR.

Une expérience d'hybridation *in situ* démontre l'expression du AhR dans les neurones GABAergiques, qui expriment GAD67¹⁵ (« glutamic acid decarboxylase 67 ») (Hays et al., 2002). Un traitement par la TCDD provoque la diminution de l'ARNm de GAD67 chez les rats. Ceci pourrait être associé à la présence d'éléments de réponse inhibiteurs à la dioxine dans les promoteurs de ces enzymes (Pinal et al., 1997).

Par ailleurs, une étude *in vitro* utilisant un modèle de neuroblastome murin, Neuro2a, montre que la TCDD augmente l'expression de la tyrosine hydroxylase, enzyme impliquée dans la synthèse des catécholamines, qui se traduit par une élévation de la quantité de dopamine et de son précurseur, la L-Dopa (Akahoshi et al., 2009). L'étude révèle que la régulation de la tyrosine hydroxylase par la TCDD *via* le AhR n'est pas dépendante d'une liaison du AhR avec une séquence XRE consensus mais avec un élément de réponse de séquence alternative suggérant l'intervention d'un complexe transcriptionnel impliquant le AhR mais pas nécessairement ARNT. Le mécanisme reste à élucider.

La concentration de sérotonine est aussi altérée après une exposition à la TCDD. Des rats adultes exposés à la TCDD ont une augmentation de la concentration en sérotonine et d'acide 5 hydroxyindole-3-acétique (5HIAA, métabolite de la sérotonine) dans le cerveau, corrélée à une augmentation de la concentration de tryptophane (précurseur de la sérotonine) dans le plasma (Unkila et al., 1993).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la TCDD pourrait moduler la signalisation de certains neurotransmetteurs en modifiant soit la quantité de ces molécules (par régulation de l'expression des enzymes les synthétisant) soit la quantité de récepteurs impliqués dans leur détection (ex : NMDA). Ces études sont intéressantes compte tenu de l'importance de ces neurotransmetteurs (glutamate, catécholamines) et notamment de la variation de leur concentration dans certaines structures cérébrales lors de la mise en place de certaines pathologies.

¹⁵ GAD67 est une des enzymes de synthèse du neurotransmetteur GABA (« γ aminobutyric acid »)

3. Effets neurotoxiques de la TCDD sur le système nerveux périphérique

La TCDD est également toxique pour le système nerveux périphérique. En effet, l'injection d'une dose unique de 8,8 µg/kg de TCDD par voie intrapéritonéale à une rate gestante provoque, 10 mois plus tard chez les rats devenus adultes, la diminution de la vitesse de conduction des nerfs moteurs et sensoriels ainsi que des polyneuropathies (atteintes de multiples nerfs périphériques) (Grehl et al., 1993).

4. Neurotoxicité indirecte de la dioxine

a) Effets de la TCDD sur le système thyroïdien

La TCDD a été décrite comme un perturbateur endocrinien. Des rates gestantes ont été exposées à de faibles doses de TCDD (0,2 µg/kg) du premier jour de gestation jusqu'au sevrage des ratons. L'analyse des niveaux d'hormones thyroïdiennes T3 et T4 des ratons montre une diminution significative de ces hormones par la TCDD qui pourrait être liée à l'induction d'une enzyme impliquée dans le catabolisme des hormones T4 (Ahmed, 2011). Les enzymes thyroïdiennes jouant un rôle essentiel dans la mise en place du système nerveux central, notamment au niveau du cervelet (Koibuchi, 2008). Un hypothyroïdisme durant la période périnatale ainsi que des mutations des récepteurs des hormones thyroïdiennes sont associés à des défauts de l'architecture et de la composition du cortex cérébelleux : i) diminution de la prolifération des précurseurs des cellules granulaires de la couche EGL ii) défaut de la migration radiale des cellules granulaires (migration des cellules granulaires de la couche EGL vers la couche IGL) iii) altération de la morphologie des fibres des cellules de Bergmann iv) diminution de l'arborisation dendritiques des cellules de Purkinje v) retard de différenciation des oligodendrocytes et des interneurons GABAergiques (Chatonnet *et al.*, 2011, Martinez *et al.*, 2011). Ainsi une diminution du taux d'hormones thyroïdiennes par la TCDD peut entraîner des défauts de développement cérébral et une altération de la fonction cérébelleuse.

b) Effets de la TCDD sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière constituée de cellules endothéliales jointives (caractérisée par la présence de jonctions serrées), d'astrocytes, de péricytes (cellules de soutien) ainsi que de neurones (neurites) (Figure 24)

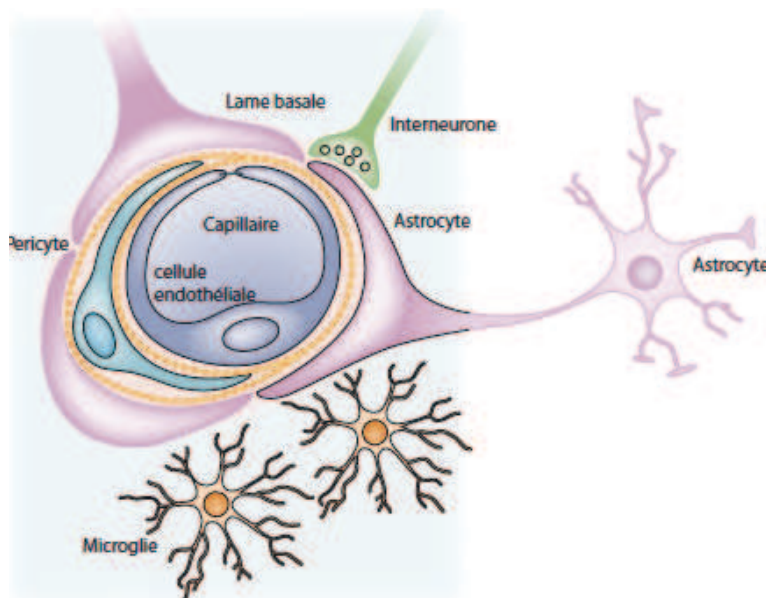


Figure 24 : Constituants cellulaires de la barrière hémato-encéphalique.

(Adapté de (Abbott et al., 2006).

Elle constitue la première ligne de défense du cerveau. Une altération de l'intégrité de la BHE peut provoquer des défauts d'apport en nutriments aux neurones (dioxygène, glucose, ...) ainsi que l'entrée d'agents pathogènes. Plusieurs études montrent que le AhR est exprimé dans les cellules endothéliales de la BHE chez les souris (Filbrandt et al., 2004), les rats (Jacob et al., 2011) et chez l'Homme (Dauchy et al., 2008). Chez l'Homme, seul le AhR est détecté dans les cellules endothéliales (le PXR et le CAR sont indétectables) (Dauchy et al., 2009). La culture primaire de cellules endothéliales de souris a permis de mettre en évidence une distribution de manière égale du AhR dans le compartiment cytoplasmique et nucléaire. De plus, une équipe a également montré son expression dans le cytoplasme des astrocytes (Filbrandt et al., 2004). Lorsque les cellules endothéliales et les astrocytes sont traités par de la TCDD, une augmentation de l'expression des cytochromes Cyp1a1 et Cyp1b1 est observée (Filbrandt et al., 2004). Ceux-ci peuvent engendrer des métabolites toxiques ainsi que des ERO, éventuellement responsables d'un stress oxydant.

La neurotoxicité de la dioxine sur le système nerveux central pourrait être ainsi due à une augmentation de stress oxydant dans les constituants primaires de la BHE responsable d'une altération de son intégrité à l'origine d'une perturbation de l'homéostasie du système nerveux.

C. Rôle endogène du AhR dans le système nerveux central

Très peu d'études ont été réalisées sur les fonctions endogènes du AhR dans le système nerveux central. Un article montre que l'absence du AhR dans le modèle de souris KO AhR^{A2/A2Bradfield} provoque une diminution d'environ 30% de la quantité d'ADN présente dans le cervelet comparé à des souris sauvages. De plus, le niveau d'expression du récepteur au GABA(A) α 6 (marqueur des cellules granulaires matures) est diminué de 30% (Collins et al., 2008). Cette diminution peut être due à différents processus comme des défauts de prolifération ou de migration des précurseurs des cellules granulaires ou bien à une mort neuronale. Des expériences d'inactivation du AhR (utilisation de siRNA dirigés contre le AhR) ont aussi été réalisées dans des cultures primaires de neurones corticaux (Lin et al., 2008). Cette équipe s'est concentrée sur les récepteurs NMDA (voir plus haut ; et ci-dessous figure 24). L'inactivation du AhR dans ces neurones diminue l'influx de calcium intracellulaire (provoqué par de fortes doses de NMDA) ainsi que le nombre de cellules nécrosées. Ces résultats suggèrent que l'absence de AhR protège les neurones contre l'excitotoxicité des récepteurs NMDA. De plus, il a été montré une diminution de l'expression de certaines sous-unités constituant le récepteur NMDA (sous-unité NR1 et NR2A) et une diminution du nombre de récepteurs présents à la surface des neurones. L'absence du AhR induit une augmentation de la quantité de BDNF dans les neurones traités par du NMDA. Le mécanisme proposé pour expliquer ce résultat est que l'inactivation du AhR diminue préférentiellement l'expression des sous-unités NR1 et NR2A des récepteurs extrasynaptiques levant ainsi leur effet antagoniste sur l'induction du facteur BDNF (par les récepteurs synaptiques) dont l'expression est par conséquent augmentée (Figure 24).

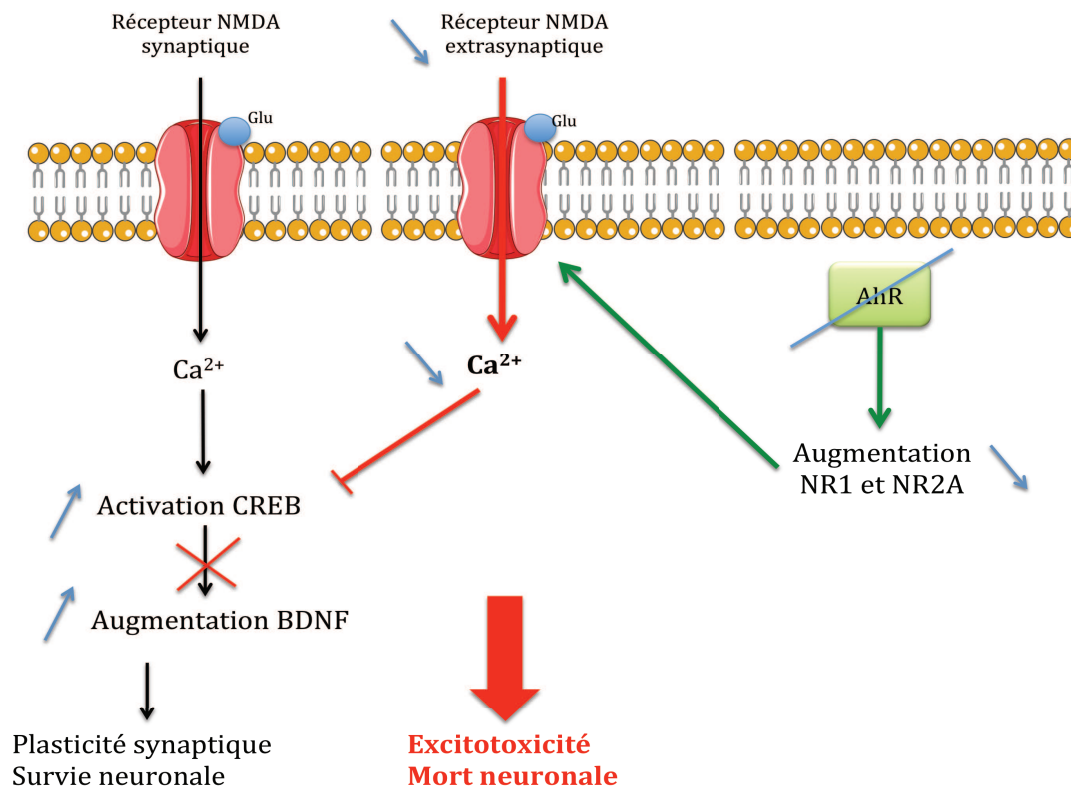


Figure 24 : Effet de l'invalidation du AhR sur la signalisation des récepteurs NMDA.

L'activation des récepteurs NMDA synaptiques entraîne une élévation du Ca^{2+} intracellulaire qui va activer le facteur de transcription CREB. Ce facteur provoque l'augmentation de l'expression de gènes dont le BDNF, impliqués dans la plasticité synaptique et la survie cellulaire. En parallèle, les récepteurs NMDA extrasynaptiques provoquent l'entrée d'une grande quantité de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ qui entraîne une inhibition du facteur CREB et l'activation d'enzymes induisant une excitotoxicité et la mort neuronale. L'invalidation du AhR (suivre les traits et les flèches bleues) provoque une diminution des sous-unités des récepteurs NMDA extra-synaptiques, une diminution de l'entrée de Ca^{2+} , ce qui lève l'inhibition de l'expression du BDNF. Adapté de (Lin et al., 2009).

Le AhR intervient également, indépendamment d'une liaison à un ligand exogène, dans le contrôle du cycle cellulaire: une équipe a travaillé sur la lignée de cellules DAOY (cellules dérivées d'un médulloblastome, cancer provoqué par la prolifération anormale des précurseurs des cellules granulaires ou GNP du cervelet chez l'enfant) (Dever & Opanashuk, 2012). Ils ont créé une lignée dans laquelle l'expression du AhR a été diminuée d'environ 70% (par une stratégie utilisant des shRNA). Les cellules transfectées, prolifèrent moins que les cellules transfectées par le shRNA contrôle. La diminution de la prolifération est corrélée à une diminution d'expression du facteur transcriptionnel Hes1, impliqué dans la prolifération des GNP et à une augmentation de l'expression de la protéine p27^{kip1} qui provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1.

D'autres études ont, à l'inverse, été menées en augmentant l'expression intracellulaire du AhR : les cellules de la lignée de neuroblastomes de souris Neuro2a ont été transfectées de manière stable avec un plasmide d'expression codant le AhR de rat. Ces cellules acquièrent des neurites de nature axonale, comme le démontre le marquage positif avec NF-H (neurofilaments, exprimés dans les axones) (Figure 25), et cdc42 (protéine impliquée dans la croissance axonale) (Akahoshi et al., 2006).

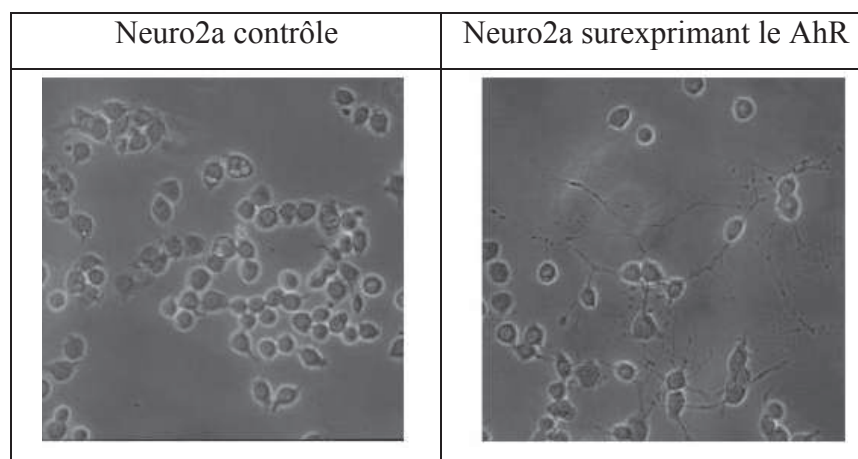


Figure 25 : Image en contraste de phase des neurofilaments phosphorylés NF-H dans les cellules Neuro2a surexprimant ou non le AhR.

(Akahoshi et al., 2006).

De plus, la surexpression du AhR dans ces cellules induit une surexpression de l'enzyme de synthèse des catécholamines (la tyrosine hydroxylase) pouvant aboutir à une différenciation catécholaminergique. Ces deux études suggèrent que l'expression du AhR favorise la différenciation des précurseurs neuronaux et inhibe leur prolifération.

D. Hypothèse de travail

La localisation du AhR dans le système nerveux central et périphérique chez le rongeur n'est pas bien définie. Les techniques d'hybridation *in situ* mises en œuvre pour identifier l'expression du AhR ont donné des résultats contradictoires. De plus, les expériences d'immunohistochimie qui ont permis de localiser le AhR dans certaines zones précises du cerveau n'ont pas utilisées comme contrôle négatif les souris AhR invalidées pour ce récepteur, ce qui ne permet pas une interprétation définitive des résultats. Cependant, le traitement intra-péritonéal de souris par la TCDD entraîne une augmentation de l'expression du Cyp1A1, gène cible du AhR, dans différentes zones du cerveau (cervelet, hippocampe,

cortex). Ce résultat suggère une expression du AhR dans le système nerveux central chez la souris, toutefois probablement plus faible que dans d'autres organes, comme le foie.

La TCDD perturbe différents processus cellulaires de modèles neuronaux et gliaux. Ce polluant environnemental altère la différenciation de nombreuses cellules du système nerveux central (oligodendrocytes, astrocytes, et précurseurs neuronaux), augmente l'apoptose de certains précurseurs neuronaux et altère leur prolifération (augmentation de la prolifération des précurseurs des cellules granulaires et, au contraire, diminution de la prolifération des précurseurs neuronaux présents dans le proencéphale). La TCDD provoque par ailleurs une perturbation de la sécrétion de certains neurotransmetteurs comme le GABA, la dopamine et la sérotonine en agissant soit sur leur synthèse (régulation transcriptionnelle des enzymes) soit sur leurs récepteurs spécifiques. La plupart des effets neurotoxiques de la TCDD sont dus à l'activation de son récepteur, le AhR, comme le démontre l'utilisation de souris invalidées ou de shRNA. Deux mécanismes peuvent expliquer cette toxicité :

- Le premier mécanisme emprunterait la voie de signalisation classique du AhR présentée dans le paragraphe 5a. La TCDD se lie à son récepteur cytoplasmique et régule l'expression de gènes cibles. Comme cela a été décrit dans cette introduction, ces régulations peuvent être soit positives soit négatives.
- Le deuxième mécanisme implique un rôle physiologique du AhR dans le système nerveux. Lorsque l'organisme est exposé à un ligand exogène comme la TCDD, le AhR est « détourné » de son rôle physiologique et active l'expression des gènes des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (Sartor et al., 2009).

Peu d'études ont porté sur un éventuel rôle endogène du AhR dans le système nerveux. Cette hypothèse reste donc à tester. Des études montrent i) une altération du niveau d'expression d'un marqueur des cellules granulaires matures chez les souris AhR^{-/-} (Collins et al., 2008) ii) le rôle protecteur du AhR face à l'excitotoxicité du glutamate (Lin et al., 2009). Toutefois, nous ne disposons d'aucune donnée sur d'éventuels troubles comportementaux des souris déficientes en AhR. L'existence de troubles comportementaux suggérerait un rôle endogène du AhR dans le développement ou l'homéostasie du système nerveux central.

III. Objectifs de la thèse

L'objectif principal de mon travail a été de caractériser le(s) rôle(s) endogène(s) du AhR dans le système nerveux chez la souris. Pour réaliser cette étude, le modèle de souris invalidées pour le AhR développé par le Dr. Pedro Fernandez-Salguero a été utilisé. Seules les souris mâles ont été incluses, afin de s'affranchir de l'interaction entre les voies du AhR et des récepteurs aux œstrogènes (paragraphe I-A.8.d). Deux études ont été menées en parallèle.

La première étude a porté sur la recherche de troubles comportementaux chez les souris AhR^{-/-} (chapitre IV). Nous avons ainsi mis en évidence la présence de troubles oculomoteurs qui se traduisent par des mouvements horizontaux involontaires et réguliers des yeux, appelés nystagmus pendulaire horizontal. La première partie de mon travail de thèse s'est portée sur l'étude des mécanismes associés à ce phénotype unique qui pourrait faire des souris AhR un modèle d'étude de nystagmus congénital. Par ailleurs, des problèmes moteurs ont été observés chez les souris transgéniques. Ce résultat nous a conduit à nous intéresser plus spécifiquement au système nerveux périphérique et aux cellules de Schwann. En effet, des expériences d'hybridation *in situ* menées ont démontré l'expression du AhR dans les précurseurs des cellules de Schwann.

Dans une seconde partie, nous avons réalisé des études mécanistiques afin d'identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles du AhR et de la dioxine (Chapitre V). Sur la base des études d'expression déjà publiées, nous avons entrepris une étude génomique à grande échelle dans le cervelet de souris. Nous avons comparé l'expression des gènes dans le cervelet de souris mâles adultes AhR^{+/+} et AhR^{-/-} traitées ou non par 10 µg/kg de TCDD pendant 48h. Cette étude nous a permis de mettre en évidence des gènes régulés spécifiquement par le AhR en absence de ligand exogène mais les analyses statistiques utilisant le logiciel « Focus » entreprises par la suite ont révélé deux aspects inattendus des propriétés du récepteur. Premièrement, la comparaison des effets de la TCDD chez la souris AhR^{+/+} et la souris AhR^{-/-} montre que la régulation de certains gènes cibles est inversée par le génotype, ce qui suggérerait ainsi un rôle modulateur du AhR (encore inexpliqué) sur les effets de la TCDD. Deuxièmement, nous avons démontré que les régulations de gènes cibles du AhR étaient majoritairement équivalentes entre les souris AhR^{+/+} traitées à la TCDD et chez les souris AhR^{-/-} non traitées. Ce résultat est en faveur de l'hypothèse de fonctions physiologiques du AhR détournées lors d'une exposition à un ligand exogène (ici la TCDD).

La découverte de cette nouvelle forme d'action de la TCDD (« de perturbation des fonctions physiologiques ») m'a conduite à participer à des études sur un autre modèle de

perturbation endogène, le foie. En effet, les souris AhR^{-/-} développent une fibrose portale que nous avons également observée chez des souris traitées par la TCDD de manière prolongée (Chapitre VI). Dans ce travail, j'ai notamment mené, en plus des traitements à la TCDD utilisées pour les analyses sur le cervelet, un travail à la fois de caractérisation histologique et d'étude d'expression des marqueurs de fibrose dans le foie. Nos résultats vont dans le même sens que ceux de la seconde partie de ma thèse, suggérant une perturbation de l'homéostasie du foie par la TCDD équivalente à celle observée chez les souris AhR^{-/-}. L'une des hypothèses mécanistiques pour expliquer l'origine de la fibrose est la transition épithélio-mésenchymateuse (ou TEM) dont l'étude au laboratoire a également conduit à des publications auxquelles j'ai participé (Bui *et al.*, 2009).

En conclusion, mes travaux sont en faveur de l'idée d'un rôle du AhR dans le maintien de l'homéostasie du système nerveux et posent l'hypothèse d'un rôle endogène du récepteur potentiellement perturbé par la présence de xénobiotiques. Ces travaux m'ont conduite à participer à l'écriture de deux revues générales sur les propriétés transcriptionnelles du récepteur en intégrant l'importance de la nature de ses ligands dans les réponses induites (notamment les ligands endogènes récemment caractérisés).

Article 1 : Oculomotor deficits in Aryl hydrocarbon Receptor null mouse.

Auteurs: Aline Chevallier, Antoine Mialot, Jean-Maurice Petit, Pedro Fernandez-Salguero, Robert Barouki, Xavier Coumoul, Mathieu Beraneck

Article en révision chez PLoS ONE

Résultats

IV. Déficits oculomoteurs chez les souris déficientes pour le AhR

Article en révision dans le journal PLoS ONE.

A. Contexte scientifique

Ma première étude a porté sur le rôle du AhR dans le système nerveux central des souris.

Les différentes études phylogénétiques montrent que le AhR est conservé chez les vertébrés et les invertébrés avec un ancêtre commun datant de 3,5 milliards d'années (Hahn, 2002). Chez les invertébrés, ce facteur de transcription ne lie pas les xénobiotiques classiquement utilisés dans les modèles de vertébrés, comme la TCDD, suggérant que la fonction de récepteur aux xénobiotiques du AhR a été acquise après la séparation des vertébrés et des invertébrés. De plus, les orthologues du AhR chez les invertébrés sont impliqués dans le développement et l'homéostasie du système nerveux (paragraphe II). Nous avons émis l'hypothèse que ce rôle physiologique du AhR pourrait avoir été conservé dans le système nerveux des mammifères et que de nouvelles fonctions issues de la liaison aux xénobiotiques pourraient s'être développées au cours de l'évolution.

En collaboration avec le Dr. Beraneck du CEsEM (Centre d'étude de la SensoriMotricité), une exploration des mouvements oculaires a été entreprise dans le but de mettre en évidence d'éventuels troubles sensorimoteurs. L'étude des mouvements oculaires n'est pas classiquement effectuée en première intention. Cependant, la proximité entre les deux laboratoires nous a conduit à réaliser ce type d'étude en premier. De plus, les mouvements de stabilisation du regard sont des réflexes bien caractérisés chez les vertébrés. L'anatomie et la physiologie des circuits impliqués sont connues. Les organes et régions d'intérêts incluent la rétine et les afférences visuelles, l'oreille interne, le tronc cérébral, le cervelet et les muscles extra-oculaires. Une altération survenant dans l'une de ces régions produit des mouvements oculaires anormaux caractéristiques (Stahl, 2004).

Les mouvements de l'œil sont assurés par trois paires de muscles antagonistes : 4 muscles droits appelés rectus (supérieur, inférieur, médian et latéral) et 2 muscles obliques

(supérieur et inférieur) (Figure 26). Ces muscles permettent les mouvements des yeux selon trois axes : horizontal (adduction et abduction¹⁶), vertical et torsion (interne ou externe).

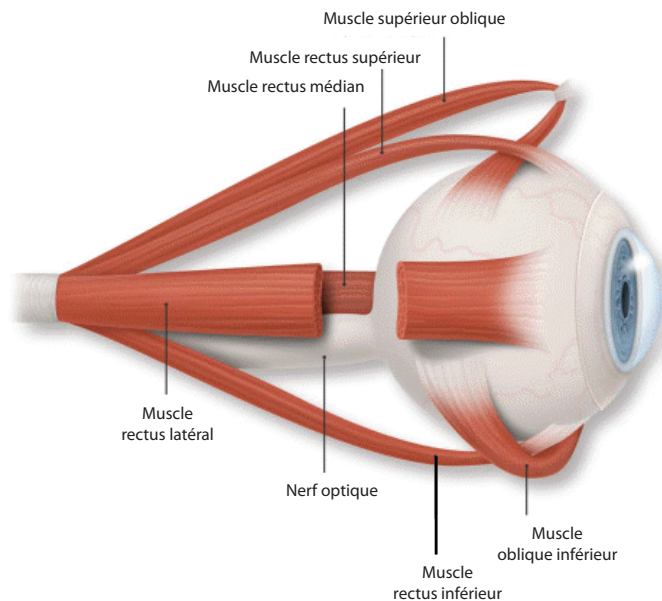


Figure 26 : Représentation schématique de l'insertion des 3 paires de muscles extra-oculaires sur l'œil droit.

Adapté de <http://www.pfofflaserandeye.com/anatomy.htm>

Les muscles extra-oculaires sont contrôlés par 3 nerfs crâniens :

- le nerf abducens (nerf crânien VI) innerve le muscle rectus latéral. Son noyau est localisé sous le 4^{ème} ventricule.
- Le nerf trochléaire (nerf crânien IV) innerve le muscle oblique supérieur dont le noyau est localisé dans le mésencéphale au niveau des colliculus inférieurs.
- Le nerf oculomoteur (nerf crânien III), dont le noyau est situé dans le mésencéphale au niveau des colliculi supérieurs, innerve les 4 autres muscles extra-oculaires. En plus de l'innervation des muscles extra-oculaires, ce nerf contrôle également les muscles releveurs de la paupière et la constriction de la pupille (myosis).

¹⁶**Adduction** : mouvement des yeux de la tempe vers le nez ; **abduction** : mouvement des yeux du nez vers la tempe

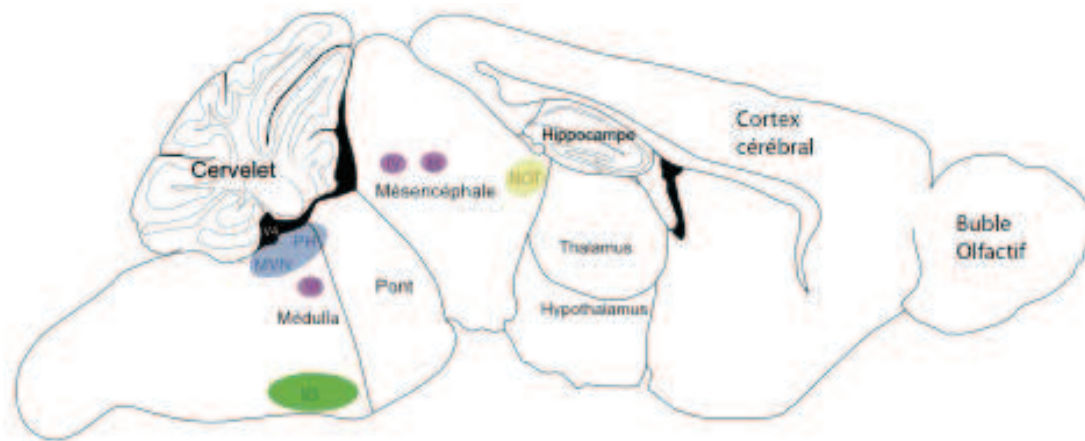


Figure 27 : Représentation simplifiée du cerveau de souris (coupe sagittale)

En bleu, MVN : noyaux vestibulaires médians, PH : Prepositus Hypoglossi ; en vert, IO : Olive inférieure ; en rose, noyaux des nerfs oculomoteurs (III, IV et VI) ; en jaune, NOT : Noyau du tractus optique (Adapté de (Beraneck & Lambert, 2009).

L'étude des mouvements oculaires a mis en évidence chez les souris $AhR^{-/-}$ la présence d'oscillations involontaires des yeux, sinusoïdales exclusivement horizontales (nystagmus pendulaire). Chez l'Homme, cette pathologie entraîne une diminution de l'acuité visuelle puisque les images ne peuvent être stabilisées sur la rétine. Les nystagmus sont classiquement quantifiés en terme d'amplitude et de fréquence (nombre d'oscillations/sec). Les nystagmus pendulaires peuvent être classés en deux catégories selon leur apparition au cours de la vie:

Le nystagmus congénital ou nystagmus infantile, apparaît très tôt (pendant les 6 premiers mois chez l'Homme) au cours de la vie de l'individu (Lee & Brazis, 2006). Les causes sont pour la plupart idiopathiques (origine non identifiée) ou associées à une pathologie oculaire comme une maladie de la rétine (achromatopsie¹⁷), un albinisme, une maladie métabolique (hypothyroïdisme) ou des défauts cérébraux (défauts des régions contrôlant les mouvements oculaires et des réflexes de stabilisation du regard) (Hufner et al., 2011). Des formes familiales de nystagmus infantile ont été identifiées : i) des formes autosomales dominantes liées à des mutations localisées sur le chromosomes 6p12 (gène NYS2), 7p11 (gène NYS3) et 13q (gène NYS4) (Ehrt, 2012) ii) des formes autosomales récessives ont été identifiées mais sont très rares iii) des formes gonosomales (liée à l'X) dont la plus courante est la mutation de la protéine FRMD7 (« FERM domain-containing protein 7 »). Cette protéine est exprimée durant le développement embryonnaire dans le cervelet ainsi que dans la moelle épinière et la rétine. Cette protéine joue un rôle dans la croissance

¹⁷ Pathologie du système visuel qui se manifeste par une absence de perception des couleurs.

neuronale des neurites (Betts-Henderson et al., 2010). Cependant, le lien causal entre la modification de cette protéine et la survenue du nystagmus n'a pas encore été défini.

Le nystagmus acquis apparaît plus tard dans la vie. Il est la conséquence de pathologies neurologiques ou fréquemment associées à une altération de la myéline (sclérose en plaques) (McLean & Gottlob, 2009). Une oscillopsie, c'est-à-dire la perception erronée d'une instabilité de l'environnement visuel, est souvent observée chez ces patients (Tilikete et al., 2007). L'utilisation de GABA-pentine (molécule occasionnant une libération accrue de GABA) et de mémantine (antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA) réduit l'amplitude, mais pas la fréquence, des oscillations du nystagmus (Leigh & Khanna, 2006).

Il n'existe pas à ce jour de traitement complet pour les 2 formes de nystagmus pendulaires. De plus, les mécanismes moléculaires à l'origine de ces instabilités oculaires ne sont pas identifiés. Enfin, aucun modèle de souris possédant un nystagmus pendulaire n'a été rapporté. Sur le plan physiologique, la plupart des nystagmus sont dus à une altération des mécanismes de stabilisation du regard impliquant les circuits neuronaux principalement localisés dans le tronc cérébral et le cervelet (Leigh & Khanna, 2006).

1. Les systèmes de stabilisation du regard

Les données présentées dans ce chapitre sont tirées de la revue de Büttner et Büttner-Ennever (2005), du chapitre 39 du Kandel (Goldberg 2000b) et du livre « The Neurology of Eye Movements » (Leigh & Zee 2006)

Deux réflexes complémentaires de stabilisation du regard coexistent : le réflexe vestibulo-oculaire (en anglais VOR pour « vestibulo-ocular reflex ») et le réflexe optocinétique (en anglais OKR pour « optokinetic reflex »). Ils ont pour entrées sensorielles respectives les mouvements de la tête dans l'espace (mouvement propre) et les mouvements de l'environnement visuel. Ces deux réflexes permettent par des mouvements des yeux de stabiliser une image sur la rétine, et donc une bonne perception visuelle. Ces réflexes existent depuis près de 480 millions d'années et sont communs à tous les vertébrés sous des formes variées (Graf & Klam, 2006).

Le réflexe vestibulo-oculaire permet la compensation des mouvements de la tête et repose sur les informations provenant des organes vestibulaires (décrits ci dessous). Le réflexe optocinétique, qui agit en synergie avec le VOR, compense les mouvements de l'environnement et repose sur des informations visuelles. Chez les souris, comme chez les primates, le réflexe optocinétique est plus efficace pour les fréquences de stimulation basse (<1Hz) alors que le réflexe vestibulo-oculaire est plus efficace à haute fréquence.

a) Le réflexe vestibulo-oculaire

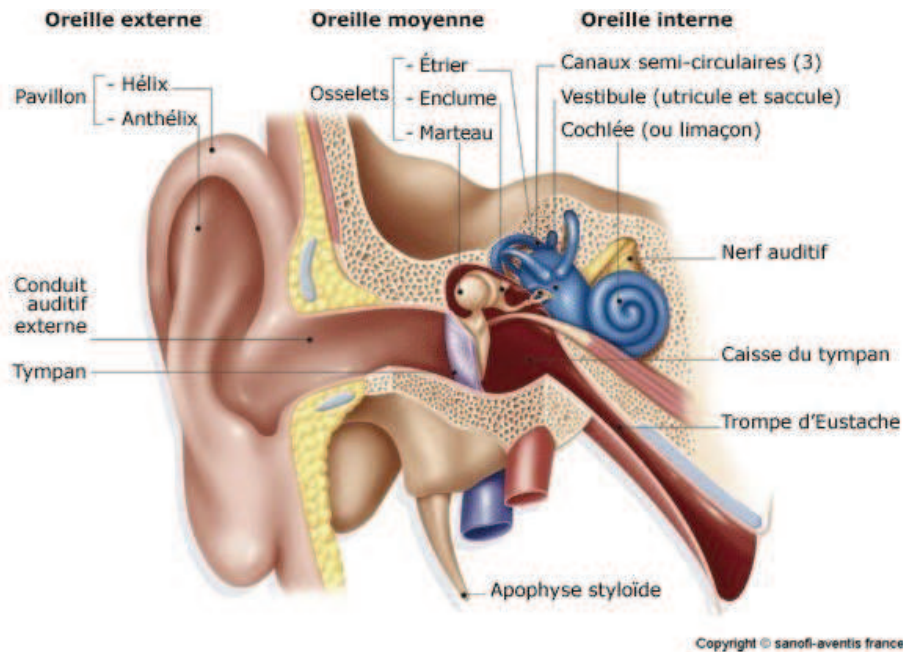
Le réflexe vestibulo-oculaire permet de stabiliser le regard au cours de mouvements de la tête. Il produit un mouvement des yeux dans le sens opposé à celui de la tête. Ce réflexe repose sur des entrées sensorielles provenant de l'oreille interne et fonctionne à l'obscurité, en l'absence de signaux visuels. Les organes vestibulaires détectent les accélérations de la tête, les neurones des noyaux vestibulaires centraux intègrent les différentes informations sensorielles et génèrent une commande motrice envoyée aux motoneurones afin de déplacer les yeux dans le sens opposé au mouvement de la tête. Le VOR est caractérisé par une succession de phases lentes compensatrices qui correspondent aux déplacements de l'œil en sens opposé à la rotation de la tête, et de phases rapides, ou saccades oculaires, qui recentrent l'œil dans l'orbite. Sur le plan expérimental, ce réflexe est étudié en soumettant l'animal à des mouvements de rotations sinusoïdales à différentes fréquences (0,2 à 2 Hz). Pendant toute l'expérience, la tête de l'animal est maintenue fixe. Le calcul du gain du VOR et de la phase permet la quantification du réflexe vestibulo-oculaire. Le gain (rapport entre la vitesse de mouvement de l'œil et la vitesse de mouvement de la tête) est le reflet de l'efficacité du réflexe. Si le gain est de 1, cela signifie que le mouvement des yeux a compensé totalement le mouvement de la tête. La phase du VOR correspond à la mesure de la synchronisation de ces deux mouvements opposés. Une phase de 0° signifie que les 2 mouvements sont synchrones.

Dans cet article, seul le VOR horizontal angulaire c'est-à-dire celui qui compense les mouvements de rotation de la tête dans le plan horizontal, a été étudié. Le réflexe vestibulo-oculaire horizontal repose sur un arc réflexe à trois neurones: les neurones vestibulaires primaires dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions de Scarpa (figure 28B), les neurones intégrateurs situés dans les noyaux vestibulaires du tronc cérébral et les motoneurones qui innervent les muscles extra-oculaires. Nous allons maintenant détailler succinctement ces trois étapes de traitement des informations vestibulaires.

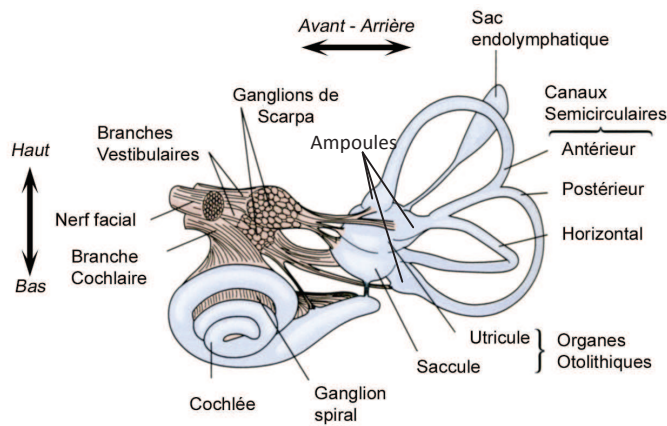
(1) Les organes vestibulaires de l'oreille interne

Les mouvements de la tête sont détectés par les organes vestibulaires localisés au niveau du labyrinthe de l'oreille interne (Figure 28).

A



B



C

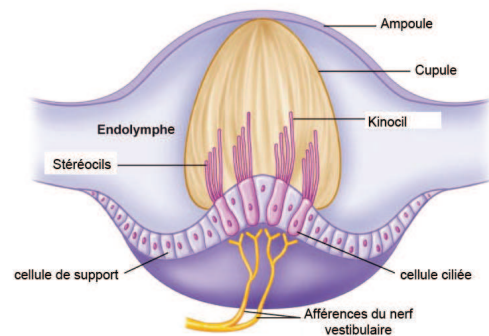


Figure 28 : Le système vestibulaire

L'oreille interne est une des parties de l'oreille qui contient les canaux semi-circulaires, les otolithes (utricule et saccule) ainsi que la cochlée. A la base de chaque canal semi-circulaire se situe l'ampoule constituée d'endolymphe et d'une cupule où sont localisées les cellules ciliées. A. Représentation schématique de l'oreille. L'oreille interne est la partie colorée en bleu (Adapté d'un schéma de Sanofi-Aventis) B. Organisation de l'oreille interne gauche (Adapté de Goldberg & Hudspeth (2000). C. Agrandissement de l'ampoule contenant la cupule et les stéréocils (Adapté de Pearson education).

Les accélérations linéaires (gravité) sont détectées par les otolithes (utricule et saccule chez les mammifères, Figure 28B) alors que les accélérations angulaires sont détectées par les 3 canaux semi-circulaires (horizontal, antérieur et postérieur, Figure 28B). Seuls les systèmes de détection de l'accélération angulaire seront décrits ici. Les canaux semi-circulaires possèdent une anatomie tridimensionnelle qui permet la détection des accélérations dans les trois plans de l'espace. Les canaux semi-circulaires sont remplis d'un fluide appelé endolymphe, riche en ions K^+ et pauvre en Na^+ . A la base de chacun de ces canaux, se situe un renflement bulbeux appelé crête ampullaire (ampulla, Figures 28B et 28C) qui abrite les cellules ciliées orientées vers la lumière de l'ampoule. Celles-ci assurent la transduction du signal mécanique en signaux électriques. Elles sont caractérisées par la présence à leur pôle apical de stéréocils et d'un kinocil (stéréocil plus grand que les autres) localisés dans une masse gélatineuse, la cupule (kinocilium et cupula, figure 28C). Au repos, les cellules ciliées libèrent spontanément du glutamate au niveau des synapses qu'elles forment avec les neurones vestibulaires primaires. Une déformation de la cupule lors d'une rotation de la tête provoque les mouvements des différents cils de ces cellules sensorielles. Soit les stéréocils se déplacent vers le kinocil ce qui provoque l'ouverture des canaux K^+ situés à l'extrémité des cils et la dépolarisation de la cellule ciliée qui libérera une plus grande quantité de glutamate ; soit les stéréocils se déplacent dans la direction opposée au kinocil ce qui entraîne la fermeture des canaux K^+ , une hyperpolarisation des cellules ciliées et une diminution de la libération de glutamate (figure 29).

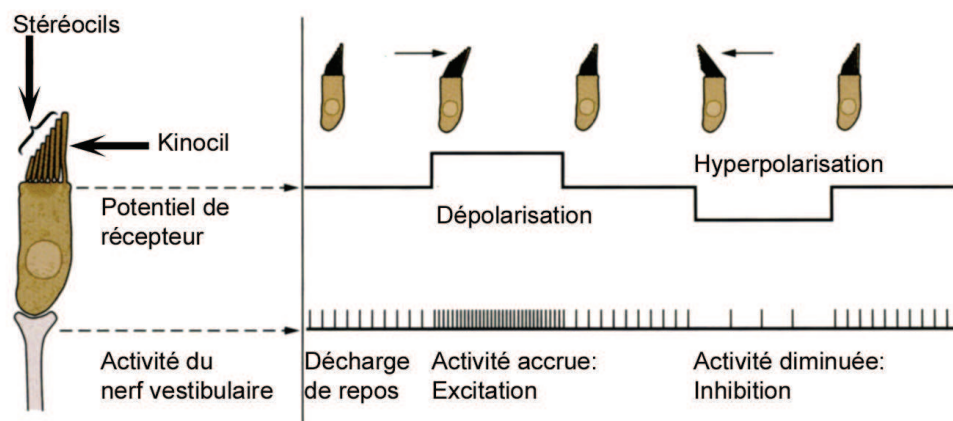


Figure 29 : Représentation schématique du fonctionnement des cellules ciliées de l'oreille interne.

Au repos, la cellule ciliée libère spontanément du glutamate (« resting discharge »). Lors d'un mouvement de la tête, les stéréocils de ces cellules vont se déplacer soit vers le kinocil ce qui induit une dépolarisation des cellules ciliées et une hypersécrétion glutamatergique (excitation), soit dans le sens opposé du kinocil ce qui induit une hyperpolarisation et une diminution de la sécrétion de glutamate (inhibition). Adapté de Goldberg & Hudspeth (2000).

(2) Les noyaux vestibulaires centraux

La libération de glutamate par les cellules ciliées active les neurones vestibulaires primaires dont les corps cellulaires sont localisés dans le ganglion de Scarpa. Les axones de ces neurones vestibulaires primaires forment une partie du nerf vestibulo-cochléaire (nerf crânien VIII) et projettent leurs axones au niveau des noyaux vestibulaires centraux localisés dans le tronc cérébral. Il existe quatre noyaux vestibulaires centraux: les noyaux supérieur, inférieur, médian et latéral (Figure 30).

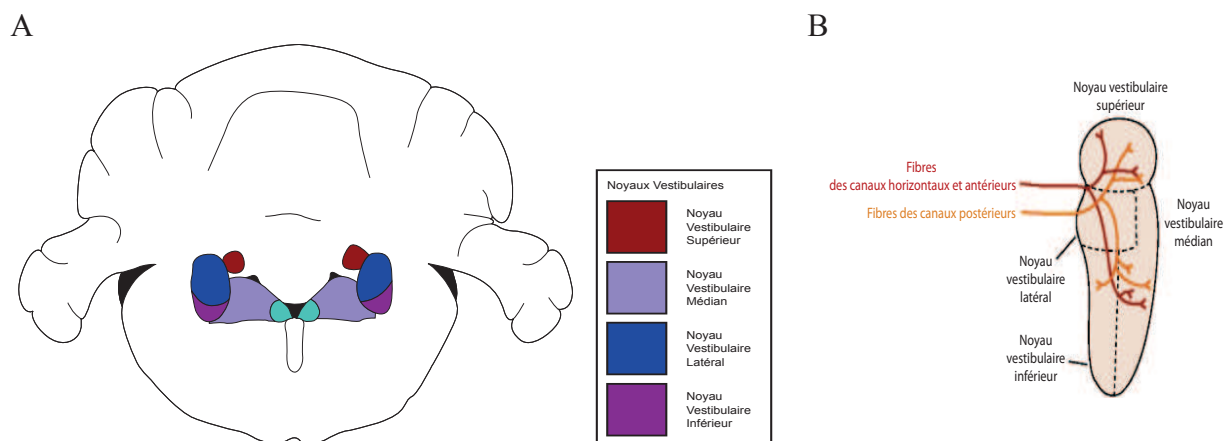


Figure 30 : Localisation (A) et afférences (B) des noyaux vestibulaires du tronc cérébral.

Les noyaux vestibulaires sont localisés dans le tronc cérébral. Les quatre noyaux reçoivent différentes afférences provenant des trois canaux semi-circulaires. En vert, les noyaux du Prepositus Hypoglossi sont représentés. A) adapté de la thèse du Dr. E. Idoux, B) Adapté du livre « Principles of neural science » de Pr E. Kandel.

Ces noyaux intègrent les informations provenant des organes vestibulaires avec celles en provenance du cervelet, de la moelle épinière et du système visuel. Ils projettent sur de nombreuses cibles telles que les noyaux vestibulaires contralatéraux, les noyaux oculomoteurs, les régions vestibulaires du cervelet (le flocculus, le nodulus, le paraflocculus et l'uvula) ou encore le thalamus. Les quatre noyaux vestibulaires traitent des informations spatiales différentes et se différencient selon leurs afférences et leur efférences (Figure 30B). De manière simplifiée, on retiendra que le réflexe vestibulo-oculaire dépend essentiellement des noyaux vestibulaires médian (NVM) et supérieur (NVS). Les noyaux vestibulaires latéral (NVL) et inférieur (NVI) sont eux essentiellement impliqués dans la stabilisation du cou et de la posture.

(3) Le réflexe vestibulo-oculaire angulaire horizontal

Le réflexe vestibulo-oculaire permet un mouvement compensatoire des yeux dans la direction opposée au mouvement de la tête. Par exemple, si la tête de l'animal tourne vers la gauche, les yeux se déplacent vers la droite et vis-et-versa. Le déplacement des yeux dans le plan horizontal n'implique que les muscles extra-oculaires rectus latéraux et médians. Les différents réseaux impliqués dans ce réflexe sont schématisés dans la figure 31.

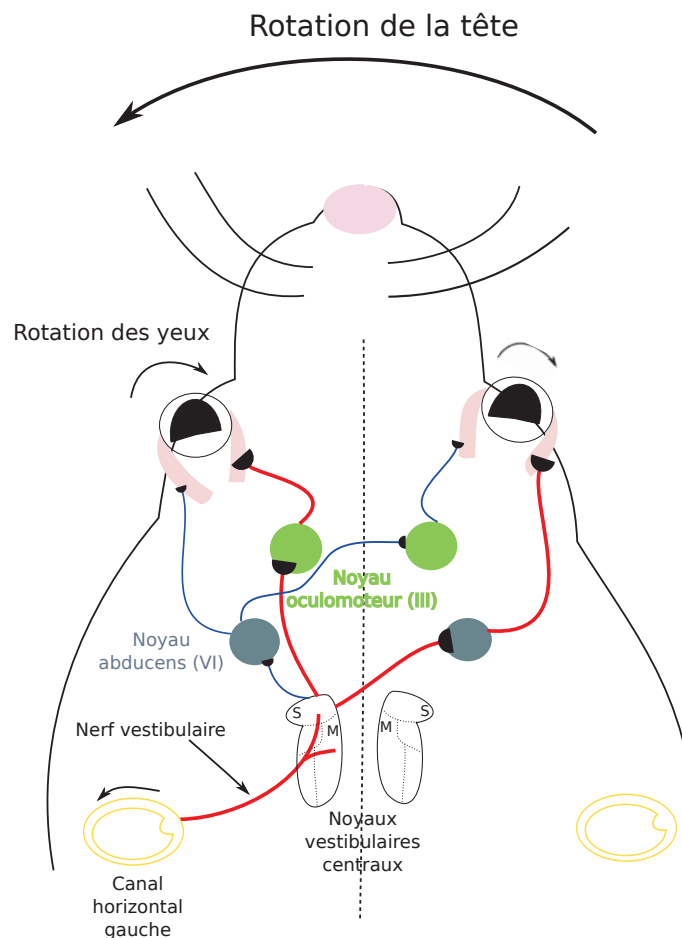


Figure 31 : Le réflexe vestibulo-oculaire horizontal.

Les canaux semi-circulaires détectent les accélérations de la tête et transmettent l'information jusqu'aux noyaux vestibulaires centraux qui l'intègrent et génèrent une commande motrice envoyée aux motoneurones des muscles extra-oculaires. Dans cet exemple, la tête du sujet bouge vers la gauche ce qui va générer un mouvement compensatoire vers la droite. Les traits rouges correspondent à des voies activatrices, alors que les traits bleus correspondent à des voies inhibitrices.

Prenons pour exemple un déplacement de la tête vers la gauche. Ce mouvement provoque l'activation des cellules ciliées du canal semi-circulaire gauche, et par conséquent, stimule les afférences vestibulaires primaires qui se projettent sur les noyaux vestibulaires médian et supérieur ipsilatéraux¹⁸. Trois types de projections sont émises à partir de ces noyaux :

- i) des projections glutamatergiques qui décussent et vont au niveau du noyau oculomoteur abducens droit et du noyau du Prepositus Hypoglossi droit¹⁹
- ii) Des connections glutamatergiques qui projettent sur le noyau oculomoteur III ipsilatéral
- iii) Des projections inhibitrices ipsilatérales qui connectent le noyau abducens gauche

Les cellules ciliées localisées dans le canal semi-circulaire droit sont, elles, hyperpolarisées par le mouvement de la tête. Ceci provoque une diminution de l'activité des noyaux vestibulaires centraux controlatéraux²⁰.

Ces deux processus entraînent la contraction des muscles rectus latéral droit et médian gauche. Le muscle rectus latéral gauche et médian droit sont relâchés. En résumé, le système vestibulaire est un système pair, symétrique, dont les deux côtés travaillent en synergie.

D'autres connexions non représentées dans le schéma sont importantes pendant le VOR horizontal :

- Des connexions commissurales inhibitrices réciproques existent entre les neurones des noyaux vestibulaires localisés de part et d'autre de la ligne médiane. Ainsi, ces connexions vont renforcer l'état d'activité des neurones: dans notre exemple, les neurones des noyaux vestibulaires gauches, qui sont plus excités, exercent une plus forte inhibition sur leurs homologues droits. Et, réciproquement, les noyaux vestibulaires droits, qui sont moins activés, ne peuvent plus inhiber leurs homologues gauches. Ces mécanismes sont la résultante de l'organisation en « push-pull » du système vestibulaire.

¹⁸ Ipsilatéral : qui se situe du même côté

¹⁹ Noyau localisé dans le tronc cérébral. Pour permettre une compensation complète du mouvement de la tête, la commande motrice des motoneurones doit contenir à la fois un signal de position et un signal de vitesse. Le noyau Prepositus Hypoglossi permet l'intégration du signal de vitesse en position afin que l'œil puisse maintenir sa position à la fin du mouvement.

²⁰ Controlatéral : qui se situe du côté opposé.

- Il existe des connections réciproques avec le cervelet qui permettent la modulation du gain et de la phase du VOR (voir paragraphe suivant : L'adaptation du VOR horizontal).

(4) L'adaptation du VOR horizontal

Au cours de la vie, le VOR est constamment calibré *via* l'utilisation des informations visuelles. En effet, une stabilisation parfaite du regard implique que les mouvements oculaires compensent exactement les rotations de la tête. Lorsque le VOR se met en place à la lumière, un glissement rétinien indique au système si le mouvement des yeux a permis ou non de garder une image fixe sur la rétine. Selon le sens du glissement rétinien (signal d'erreur), les mouvements oculaires compensateurs seront augmentés ou diminués.

L'adaptation du VOR repose sur les mêmes principes que la calibration du réflexe. Le cervelet joue un rôle clé dans cet apprentissage sensorimoteur en comparant les entrées vestibulaires et visuelles, puis en modulant la réponse des neurones vestibulaires centraux.

Au laboratoire, l'adaptation du VOR est étudiée en créant un conflit entre les entrées visuelles et les entrées vestibulaires : c'est le conflit visuo-vestibulaire. Lors du conflit, le glissement rétinien est détecté et transmis *via* les systèmes optiques accessoires (AOS) et le noyau du tractus optique (NOT). Le signal d'erreur transite par l'olive inférieure²¹ (IO) localisée dans le tronc cérébral (Figure 32). Les cellules de l'olive inférieure se projettent dans le cervelet où elles forment des synapses au niveau de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje²² *via* les fibres grimpantes. Les cellules de Purkinje localisées dans le flocculus comparent alors les informations relayées par l'olive inférieure (information visuelle) et par les organes vestibulaires et génèrent une réponse appropriée qu'elles transmettent au niveau des cellules FTN (« floccular target neuron ») situées dans les noyaux vestibulaires centraux (Shin et al., 2011). Ces FTN projettent des connections vers les noyaux oculomoteurs (abducens et oculomoteur) et modifient ainsi la commande motrice pour ajuster le mouvement des yeux.

²¹ L'olive inférieure est constituée de 3 sous-noyaux dont le chapeau dorsal, le noyau β et la colonne de cellules dorsomédian. Cette structure est impliquée dans le contrôle des mouvements oculaires.

²² La cellule de Purkinje (cellule de sortie du cervelet) est un neurone de type GABAergique.

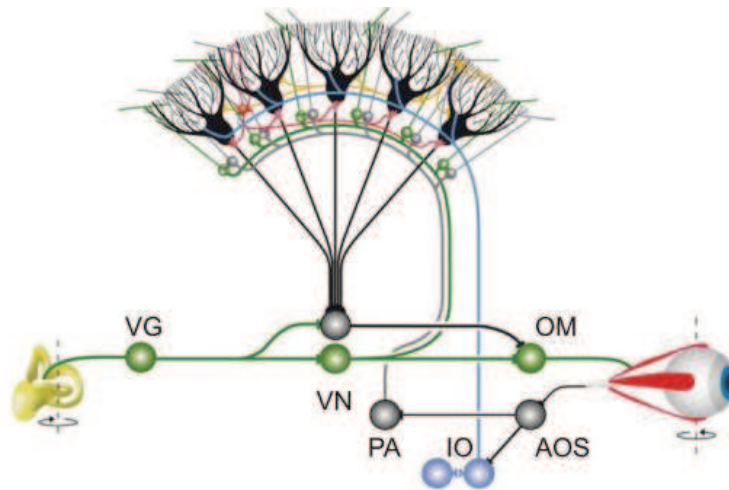


Figure 32 : Réseaux neuronaux impliqués dans le conflit visuo-vestibulaire.

Les cellules de Purkinje du vestibulo-cervelet sont représentées en noires. VG : ganglion vestibulaire, VN : noyaux vestibulaires centraux, IO : olive inférieure, AOS : système optique accessoire, OM : noyaux oculomoteurs (III ou VI), PA : région pontique. D'après (Schonewille et al., 2010).

b) Le réflexe optocinétique

Le réflexe optocinétique (OKR) est un réflexe compensatoire qui participe également à la stabilisation du regard. Ce réflexe permet de stabiliser la scène visuelle qui défile sur la rétine alors que la tête est immobile. L'OKR vise donc à supprimer le glissement rétinien, par l'envoi d'une commande motrice aux muscles extra-oculaires, afin de déplacer l'œil dans la même direction et à la même vitesse que la scène visuelle. Ce réflexe se caractérise, comme pour le VOR, par des phases lentes de poursuite, éventuellement interrompues par des phases rapides afin, si nécessaire, de recentrer l'œil dans son orbite. Chez les vertébrés à vision frontale comme les primates, l'OKR est constitué de deux composantes : la composante directe se déclenchant très rapidement et la composante indirecte dont la mise en œuvre est plus lente et progressive. Chez les animaux à vision latérale comme la souris, la composante indirecte domine le réflexe; ainsi nous ne décrirons que les mécanismes impliqués dans cette composante.

Ce réflexe repose sur des entrées sensorielles provenant de la rétine qui perçoit la scène visuelle. Le glissement rétinien active les cellules ganglionnaires de la rétine dont les axones forment le nerf optique. Les nerfs optiques se rejoignent au niveau du chiasma optique qui permet la décussation partielle d'axones. Les axones rétino-fuges se projettent dans différentes régions du cerveau (Figure 33).

(1) Les différentes voies rétino-fuges

Les afférences de la rétine se projettent vers différentes structures cérébrales qui sont décrites succinctement ci-dessous. Le réflexe optocinétique emprunte la voie du système optique accessoire.

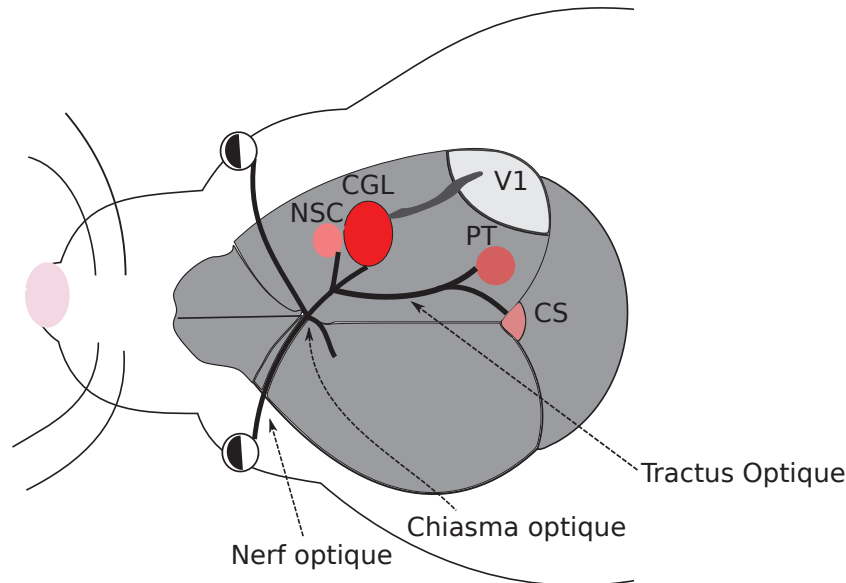


Figure 33 : Représentation schématique du système visuel chez la souris.

Les nerfs optiques se croisent au niveau du chiasma optique. Une majorité des axones forme des synapses dans le corps genouillé latéral (CGL) situé dans le thalamus, qui relaient l'information visuelle jusqu'au cortex strié (V1). Les autres axones vont se projeter dans le colliculus supérieur (CS), les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus, la voie du système optique accessoire et le prétectum (PT).

- La voie geniculo-striée :

La majorité (près de 90%) des axones du tractus optique forme des synapses au niveau du corps genouillé latéral (CGL), situé dans le thalamus. Les neurones du CGL relaient l'information visuelle jusqu'au cortex visuel primaire (cortex strié), via les radiations optiques. L'information est ensuite transmise par le cortex visuel extra-strié.

- La voie rétino-tectale

Environ 10% des axones rétino-fuges se projettent sur le colliculus supérieur situé dans le mésencéphale. Cette structure a pour fonction de coordonner les informations visuelles, auditives et somatiques en ajustant les mouvements de la tête et des yeux vers les stimuli (saccade oculaire).

- La voie hypothalamique

Une partie du tractus optique innerve les noyaux suprachiasmatiques localisés dans l'hypothalamus. Ces noyaux sont responsables de la synchronisation du rythme circadien de l'organisme.

- La voie du système optique accessoire

Cette voie est celle qui nous intéresse dans le cas du réflexe optocinétique. En effet, les neurones appartenant au système optique accessoire (AOS) et au noyau du tractus optique (NOT) sont sensibles aux déplacements de l'image sur la rétine dans une direction spécifique. Le système optique accessoire (AOS : « Accessory Optic System »), structure du mésencéphale, est constitué de plusieurs noyaux terminaux dont le noyau terminal dorsal (DTN : « Dorsal terminal nucleus »), latéral (NTL) et médian (NTM). Le NOT est un noyau qui appartient au prétectum, structure du tronc cérébral impliquée, entre autre, dans le réflexe optocinétique, l'adaptation du VOR ou encore le réflexe pupillaire.

(2) Réseaux neuronaux impliqués dans le réflexe optocinétique

Les cellules ganglionnaires impliquées dans l'OKR se projettent au niveau du noyau du tractus optique (NOT) controlatéral et du noyau terminal dorsal du système optique accessoire controlatéral. Ces noyaux reçoivent également des afférences du cortex cérébral et du colliculus supérieur. Le NOT et le DTN envoient des efférences sur la partie dorso-caudale de l'olive inférieure ipsilatérale. L'olive inférieure, *via* les fibres grimpantes, innerve les cellules de Purkinje localisées entre autre dans le vestibulo-cervelet²³. D'autres efférences partent vers les noyaux oculomoteurs, les noyaux Prepositus Hypoglossi et les noyaux vestibulaires médians (Figure 34). Les neurones du NOT répondent préférentiellement aux mouvements horizontaux de l'image sur la rétine dans la direction temporo-nasale à faible vitesse alors que le DTN du système optique accessoire répond principalement aux mouvements verticaux.

²³ Le vestibulo-cervelet est une partie du cervelet qui reçoit des afférences provenant des canaux semi-circulaires, de l'utricule et du saccule. Il est constitué de l'uvula, la nodula, le vermis et paravermis, le flocculus et le paraflocculus.

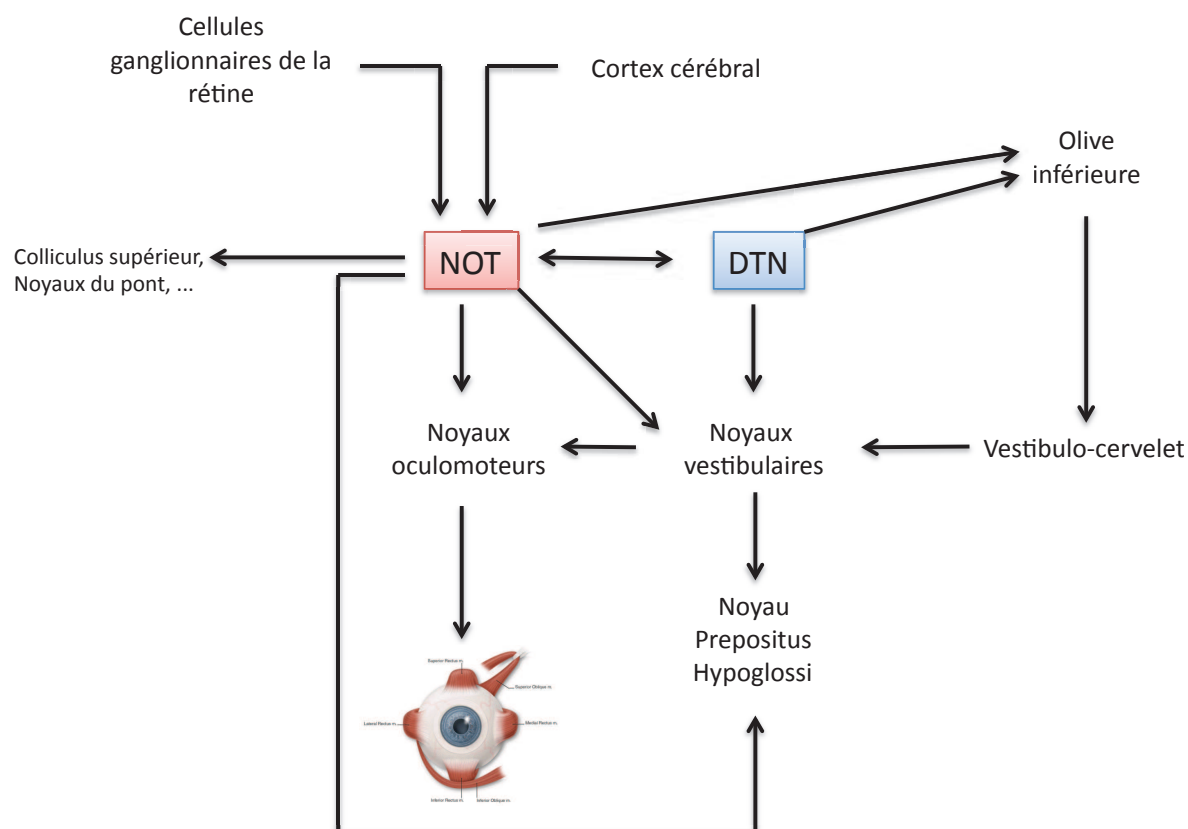


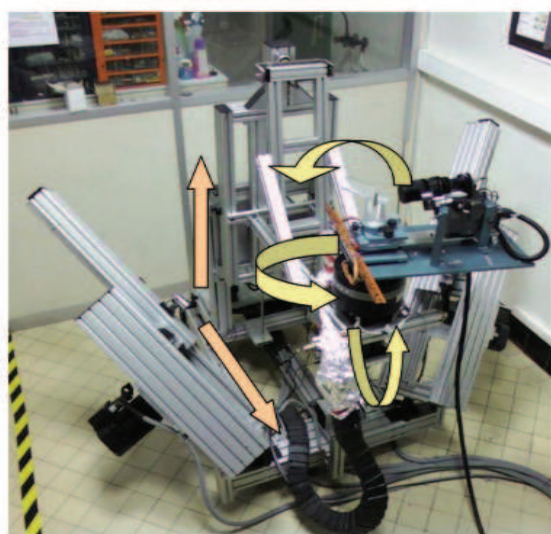
Figure 34 : Représentation simplifiée des réseaux impliqués dans le réflexe optocinétique.

Schéma non exhaustif des principales structures impliquées dans la composante indirecte du réflexe optocinétique. NOT : noyau du tractus optique, DTN : noyau terminal dorsal du système optique accessoire.

Sur le plan expérimental, ce réflexe est étudié en soumettant l'animal à une rotation à vitesse constante de la scène visuelle. Tout comme pour étudier le réflexe vestibulo-oculaire, la tête de l'animal est maintenue fixe pendant l'expérience.

Au laboratoire, les deux réflexes de stabilisation du regard (VOR et OKR) sont étudiés par vidéo-oculographie. Cette méthode consiste à enregistrer les mouvements des yeux de souris placées dans un tube en plexiglas sur le stimulateur vestibulaire. Leur tête est immobilisée à l'aide d'une tige en métal vissée sur un implant préalablement fixé directement sur le crâne de l'animal. Une source lumineuse infrarouge et une caméra sont fixées sur le stimulateur vestibulaire. Le mouvement des yeux est filmé à l'aide de la caméra. Un logiciel permet de déterminer la position des yeux par rapport à un point fixe, reflet de la source lumineuse sur la cornée (Figure 35).

A



B

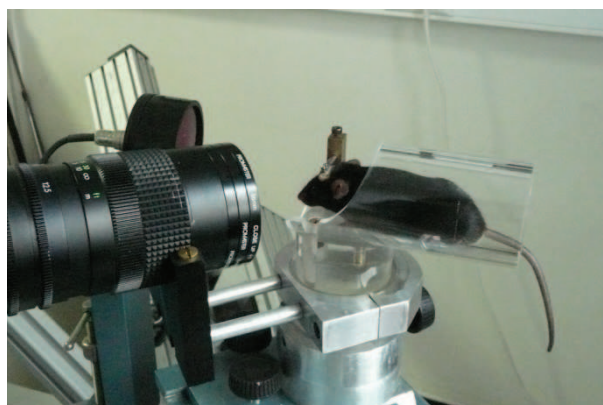


Figure 35 : Stimulateur vestibulaire.

A) Stimulateur vestibulaire à 5 axes (3 axes de rotations en jaune et 2 axes de translations horizontal et vertical qui sont symbolisés par les flèches oranges). B) Souris placée dans le stimulateur vestibulaire.

B. Buts de l'étude

Dans le premier article, le rôle du AhR dans le système nerveux central des souris a été étudié. Les premières observations de vidéo-oculographie ont mis en évidence la présence d'une instabilité oculaire de type nystagmus pendulaire horizontal chez les souris déficientes pour le AhR. Nous avons voulu déterminer l'origine de ce nystagmus des souris en étudiant chez les souris AhR^{-/-} i) le réflexe vestibulo-oculaire ii) l'adaptation du réflexe vestibulo-oculaire iii) le réflexe optocinétique iv) la localisation du AhR dans les différentes structures visuo-motrices.

Nous avons également traité des souris adultes AhR^{+/+} avec de la TCDD en sub-chronique. Chaque semaine, nous avons regardé les effets de ce traitement sur l'apparition d'un nystagmus pendulaire horizontal. En effet, quelques études démontrent que la TCDD pourrait perturber la fonction physiologique du AhR (Sartor *et al.*, 2009). Un traitement par un ligand exogène du AhR pourrait donc induire les mêmes effets que lors de l'invalidation du récepteur.

C. Résumé en français

Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques ou AhR est un facteur de transcription connu pour relayer les effets toxiques et carcinogènes de nombreux polluants environnementaux dont la 2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-p-Dioxine (TCDD). De récentes études chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et la drosophile *Drosophila melanogaster* ont démontré que les orthologues du AhR sont exprimés exclusivement dans certains neurones et sont impliqués dans le développement et l'homéostasie du système nerveux central. Bien que son rôle physiologique dans le cœur, le foie ou la gamétogenèse ait été démontré chez les mammifères, son expression ontogénique et ses fonctions neuronales restent encore à élucider. Dans cet article, nous avons montré que l'absence du AhR entraîne des mouvements involontaires des yeux, sous forme de nystagmus pendulaire horizontal. Afin de déterminer si le nystagmus a une origine vestibulaire, visuelle ou cérébelleuse, les réflexes de stabilisation du regard appelés réflexe vestibulo-oculaire (VOR) et réflexe optocinétique (OKR) ont été étudiés. L'OKR est moins efficace chez les souris AhR^{-/-} suggérant un défaut des circuits visuo-moteurs alors que le VOR est peu affecté par l'absence du récepteur. La structure du cervelet des souris AhR^{-/-} semble fonctionnelle, comme l'indique la préservation de l'adaptation du VOR, processus dépendant du cervelet. De plus, nous avons montré que le AhR est exprimé dans les cellules ganglionnaires de la rétine durant le développement embryonnaire, suggérant un possible rôle développemental. Enfin, une intoxication de souris contrôles adultes par de la TCDD n'induit pas d'instabilité oculaire comme celle observée chez les souris AhR^{-/-}. Ces résultats démontrent que l'absence du AhR provoque des déficits nerveux et suggèrent que le AhR pourrait jouer un rôle endogène au cours du développement.

Title: Oculomotor deficits in Aryl hydrocarbon Receptor null mouse.

Authors: Aline Chevallier¹, Antoine Mialot², Jean-Maurice Petit⁵, Pedro Fernandez-Salguero⁴, Robert Barouki^{1,3}, Xavier Coumoul^{1,*,#}, Mathieu Beraneck^{2,*,#}

Affiliations:

¹ INSERM UMR-S 747, Toxicologie Pharmacologie et Signalisation Cellulaire, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité.

² Centre d'Etude de la Sensori Motricité - CNRS UMR 8194, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité.

³ Service de Biochimie Métabolique, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades,

⁴ Universidad de Extremadura, Extremadura, Spain

⁵ UFR biomédicale, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité

* These authors contributed equally to this work

#Sendcorrespondence to:

Mathieu Beraneck, CNRS UMR8194, 45 rue des Saints Pères 75006 Paris France; Phone: +33 1 42 86 33 86; Fax: +33 1 42 86 33 99; E-mail: mathieu.beraneck@parisdescartes.fr

Xavier Coumoul, INSERM UMR-S 747, 45 rue des Saints Pères 75006 Paris France; Phone: +33 1 42 86 33 59; Fax : +33 1 42 86 38 68; E-mail: xavier.coumoul@parisdescartes.fr

Abbreviated title: AhR in the central nervous system

Keywords: AhR, Central Nervous System, Eyes movements, Behaviour, Nystagmus

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors' contribution:

Conception and design of experiments: Aline Chevallier, Xavier Coumoul, MathieuBeraneck

Collection of data: Aline Chevallier, Antoine Mialot, Jean-Maurice Petit, Pedro Fernandez-Salguero, Mathieu Beraneck

Analysis of data: Aline Chevallier, Antoine Mialot, Mathieu Beraneck

Interpretation of data: Aline Chevallier, Xavier Coumoul, Mathieu Beraneck

Criticalrevision of the article for important intellectual content: Aline Chevallier, Robert Barouki, Xavier Coumoul, MathieuBeraneck

Abstract

The Aryl hydrocarbon Receptor or AhR, a ligand-activated transcription factor, is known to mediate the toxic and carcinogenic effects of various environmental pollutants such as 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Recent studies in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* show that the orthologs of the AhR are expressed exclusively in certain types of neurons and are implicated in the development and the homeostasis of the central nervous system. While physiological roles of the AhR were demonstrated in the mammalian heart, liver and gametogenesis, its ontogenic expression and putative neural functions remain elusive. Here, we report that the constitutive absence of the AhR in adult mice (AhR^{-/-}) leads to abnormal eye movements in the form of a spontaneous pendular horizontal nystagmus. To determine if the nystagmus is of vestibular, visual, or cerebellar origin, gaze stabilizing reflexes, namely vestibulo-ocular and optokinetic reflexes (VOR and OKR), were investigated. The OKR is less effective in the AhR^{-/-} mice suggesting a deficit in the visuo-motor circuitry, while the VOR is mildly affected. Furthermore, the AhR is expressed in the retinal ganglion cells during the development, however electroretinograms revealed no impairment of retinal cell function. The structure of the cerebellum of the AhR^{-/-} mice is normal which is compatible with the preserved VOR adaptation, a plastic process dependent on cerebellar integrity. Finally, intoxication with TCDD of control adults did not lead to any abnormality of the oculomotor control. These results demonstrate that the absence of the AhR leads to acquired central nervous system deficits in the adults. Given the many common features between both AhR mouse and human infantile nystagmus syndromes, the AhR^{-/-} mice might give insights into the developmental mechanisms which lead to congenital eye disorders.

Introduction

The Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) is a transcription factor known to mediate most of the toxic effects of widely persistent organic pollutants such as dioxin (TCDD; 2,3,7,8 TetraChloroDibenzo-p-Dioxin). This receptor belongs to the basic helix-loop-helix Per/ARNT/Sim family (bHLH-PAS) whose members are involved in physiological processes such as circadian cycle, neurogenesis and organs development [1]. Historically, the AhR has been described as a ubiquitous xenobiotic-activated transcription factor, which promotes the elimination of xenobiotics through the regulation of the expression of genes involved in xenobiotic metabolism [2]

Interestingly, recent studies suggest that this receptor also regulates alternative signaling pathways independently of exposure to pollutants. AhR-null mice exhibit infertility, abnormalities in liver and cardiovascular problems such as a defective closure of the ductus venosus, indicative of the implication of the AhR in various developmental processes [3,4,5].

In the rodent brain, the AhR mRNA was reported to be expressed in the cerebral cortex [6], hypothalamus and brainstem [7] and in the granular cells of the cerebellum [8]. However, its putative endogenous neuronal functions in mammals remain unknown. Interestingly, invertebrates express an AhR ortholog (AhR-1 in *Caenorhabditis elegans* and Spineless in *Drosophila melanogaster*) in neurons: Spineless is expressed in the sensory neurons of the peripheral nervous system and AhR-1 is expressed in several subtypes of neurons including touch receptors and interneurons. This protein however does not bind dioxin, one of the most potent ligand and activator of the mammalian AhR [9]. Analysis of AhR-1 mutants shows that, in *C. elegans*, the receptor is implicated in GABAergic neuron cell fate [10]. Recent investigations using *Drosophila melanogaster* as a model, have confirmed the importance of AhR orthologs for the neuronal organization in invertebrates: the Spineless gene was initially identified as a critical gene for the proper specification of distal antennal identity, the establishment of the tarsal regions of the legs, and a normal bristle growth [11]. In addition, one recent report implicates Spineless in the regulation of dendritic arborization of sensory neurons [12]. The strong conservation of the AhR during species evolution [13] and its ancestral function in invertebrates suggest that in mammals, the AhR could play a significant role in the development and/or the homeostasis of the central nervous system (CNS). So far, only one study showed a reduction of the DNA content and expression of a GABAergic receptor, GABA_A6, in the cerebellum of the AhR^{-/-} mice [8]. However, the potential endogenous role of the AhR in the mammalian brain remains elusive.

In this context, we investigated the role of the AhR in the nervous system of mice. We monitored spontaneous and reflexive eye movements to assess the integrity of the gaze-related sensorimotor functions in the AhR^{-/-} mice and identified a pendular horizontal nystagmus in those animals. The basic gaze stabilizing reflexes, namely the vestibulo-ocular and optokinetic reflexes, and the adaptative capacities of the cerebellum were then evaluated.

Materials and methods

Ethics Statement, animals and treatment

All procedures used were in strict compliance with the European Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental purposes. CNRS review board and the Direction Départementale des Services Vétérinaires approved this study ; authorization number 75-1641 and 75-962. AhR^{-/-} (C57BL/6J background) and AhR^{+/+} (Wild-Type, C57BL6/J) mice are a generous gift of Pr. PM Fernandez-Salguero [3]. Twenty-one AhR^{+/+} mice, thirteen AhR^{+/-} mice and fifteen AhR^{-/-} mice were used in this study. In addition, eight male mice (10 weeks) were injected i.p. with 200 μ L of TCDD (25 μ g per kg of body weight) or the vehicle (corn oil) (four mice/group). The chronic treatment consisted of one injection of TCDD each week during 5 weeks (total of 5 injections).

Eye movements recording

Male AhR^{-/-}, AhR^{+/-} and AhR^{+/+} mice aged of 10 weeks, were included in these tests (n=9 for AhR^{+/+}, n=8 for AhR^{+/-} and n=13 for AhR^{-/-} mice). Surgical preparation and postoperative care for head implant surgery have been described previously [14]. Briefly, gas anaesthesia was induced using isoflurane. The head was shaved using an electric razor. A sagittal incision of about 2 cm was performed to access the skull. Then, a small custom-built head holder (0.3x0.3x0.5cm) was fixed using dental cement (C&B Metabond; Parkellinc, Edgewood, NY) to the skull just anterior to the lambda landmark [15]. Following the surgery, animals were isolated and closely surveyed for 48 hours. Buprenorphine (0.05mg/kg) was provided for postoperative analgesia and care was taken to avoid hypothermia and dehydration.

The experimental set-up, apparatus, and method of data acquisition used to record eye movements were similar to those previously described [14,16]. Mice were head-fixed at a ~30° nose-down position to align the horizontal semi-circular canals on yaw plane [14,15,17] and then placed in a custom built Plexiglas tube secured on the superstructure of a vestibular stimulator. Eye movements were tracked using an infrared video system (ETL-200, ISCAN, Burlington MA). Recorded eye and head (table) position signals were sampled at 1 kHz, digitally recorded (CED power1401 MkII) under Spike 2 environment and later exported into the Matlab (The MathWorks) programming environment for off-line analysis.

Stimulation protocol: light intensity in the experimental room was of 350 Lux (Luxmeter Lux-1337 Iso-tech). Light condition was used to record spontaneous eye movements, during visuo-vestibular conflict and for the optokinetic reflex. For tests performed in dark (spontaneous eye movements and VOR) all sources of light were turned off except for computer screen. The turntable is further surrounded with a closed box to isolate the animal from remaining light. "Dark" condition inside the box was measured as <0.02lux. The different tests were performed as follows: i) As eyes were recorded both at light and in the absence of light, 2% pilocarpine (Laboratoire Chauvin) was applied 10 minutes before to start the experiment to keep the pupil size constant [18,19]; ii) Spontaneous eye movements were first recorded in the absence of external stimulation at light (350lux) and then in dark (<0.02lux); iii) Vestibulo-ocular reflex in dark was tested during sinusoidal rotation of the turntable (at frequencies of 0.2; 0.5; 1 and 2Hz performed at a constant peak velocity of 50°/s); iv) Optokinetic full field stimulation

was performed at light by rotating the animal at a constant velocity of 5°/s. In the mouse, optokinetic speed tuning curve for the eye movement responses demonstrated peak gains at velocities of rotation in range 0-5°/s (Stahl et al. 2004; see figure 8A in Beraneck and Cullen, 2007); v) in a separate session, the turntable was surrounded by a box with highly contrasted pattern and no ceiling. Visuo-vestibular conflict (VVC) was then performed in light condition by rotating sinusoidally the animal en-bloc with the visual surround at 0.5Hz (i.e. table and visual surround are moving in the same direction; peak velocity 50°/s). Training sessions lasted 45 min and 2 min-long eye movement recordings were performed every 15 min. Vestibulo-ocular reflex in dark was also recorded just before and right after each VVC training paradigm.

Data analysis

Analysis procedures for horizontal angular vestibulo-ocular reflex (VOR) and optokinetic reflex (OKR) have already been reported elsewhere [14]. Horizontal and vertical eye and head movements data were digitally low pass-filtered (cut-off frequency: 40 Hz), and position data were differentiated to obtain velocity traces. Segments of data with saccades were excluded from analysis. For horizontal sinusoidal rotations, at least 10 cycles were analyzed for each frequency. VOR gain and phase were determined by the least-squares optimization of the equation (a):

$$EH_v(t) = g \cdot \{[HH_v \cdot (t - t_d)] + C^{te}\} \quad (a)$$

Where $EH_v(t)$ is eye horizontal velocity, g (gain) is constant value, $HH_v(t)$ is head horizontal velocity, t_d is the dynamic lag time (in msec) of the eye movement with respect to the head movement, and C^{te} is an offset. t_d was used to calculate the corresponding phase (ϕ°) of eye velocity relative to head velocity. The Variance-Accounted-For (VAF) of each fit was computed as:

$$\left\{ 1s \left[\frac{var(est - EH_v)}{var(EH_v)} \right] \right\}$$

Where var represents variance, est represents the modeled eye velocity, and EH_v represents the actual eye horizontal velocity. VAF values were typically between 0.70 – 1, where a VAF of 1 indicates a perfect fit to the data. Trials for which the VAF was less than 0.5 were excluded from the analysis.

Because $AhR^{-/-}$ mice show spontaneous nystagmus, OKR responses were measured as the mean eye velocities on segments longer than $2/F_n$ where F_n is the measured frequency of the spontaneous nystagmus. OKR gains were then calculated as the ratios of the mean eye velocities to the constant table velocity.

Immunohistochemistry

Mice were perfused transcardially with 4% PFA, the brain was removed and post-fixed for 3 h, and then cryoprotected in 10% sucrose. Sagittal cerebellum sections of 14 μ m were cut using cryostat (Leica CM 3050S). Sections were blocked in 10% Normal Goat Serum (NGS, Invitrogen) in PBS containing 1% triton X-100 (Sigma-Aldrich) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies mouse anti-CaBP (1:400, Swant) or guinea pig anti-VGLUT2 (1:1000, Millipore). After several washes, sections were incubated with secondary antibodies Alexa 488 Goat anti-mouse (1:400, Invitrogen) and Goat anti-guinea pig and Alexa 546 Goat anti-mouse (1:400, Invitrogen). Eyes of mouse were enucleated, post-fixed for 3h, and then cryoprotected in 10% sucrose for 1h at room temperature and in 30% sucrose overnight at 4°C. The samples were embedded in OCT solution (VWR) and frozen in isopentane. Sections of 20 μ m were cut using cryostat (Leica CM 3050S), blocked in PBS containing 0.2% of gelatin and 0.25% of Triton X-100 for 1h at room temperature and incubated with primary antibodies CaBP (1:500, Swant), Calretinin (1:500, Millipore), PKC α (1:500, Sigma), α -Recoverin (1:1000, Millipore). After washing, slides were incubated with secondary antibodies Alexa 488 chicken anti-rabbit (1:400, Invitrogen) or TRITC goat anti-mouse (1:100, Jackson ImmunoResearch). The number of retinal ganglion cells was assessed on flat mount retinal preparation after immunohistochemistry using β III-tubulin (1:500, Covance). Eight adult male mice (n=4 AhR+/+ and n=4 AhR-/-) was used and five pictures of each staining was taken for the quantification.

The sections were, then, counterstained with DAPI (1:2000, Invitrogen) and examined under an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse TE-2000E) and confocal microscope (Zeiss, LSM 710). The density of retina cells and the thickness of the layer is measured using imageJ software.

***In situ* hybridization**

AhR probes were generated using cDNA from the mouse brain. A 1,2 kb fragment of AhR (nt: 1622-2828 bp) was subcloned in pbluescriptKS+. Embryons (E12 and E14) of AhR+/+ and AhR-/- mice were removed and post-fixated during 24h in a solution containing 4% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer, pH 7.4 (PFA), cryoprotected in sucrose 10% O/N and frozen in isopentane. Coronal sections of 14 μ m were cut with a cryostat (Leica CM 3050S). Sections were mounted on superfrost gold plus slides and store at -80°C until use. Tissue sections were hybridized with digoxigenin-labeled riboprobes. Tissue sections were post-fixed for 10 min in 4% PFA, washed in PBS, pH 7.4, treated with proteinase K (5 μ g/mL; Invitrogen, Carlsbad, CA) for 2 min, postfixed for 5 min in 4% PFA, washed in PBS, acetylated, and washed in PBS 1% Triton X-100. Slides were incubated for 2 hr at room temperature in hybridization buffer (50% formamide, 5X SSC, 1XDenhardt's, 240 μ g/mL yeast tRNA, and 500 μ g/mL DNA salmon sperm), and then tissue sections were hybridized overnight at 72°C with riboprobes (0.5 ng/ μ L). After hybridization, sections were rinsed for 2 hr in 2x SSC at 72°C and blocked in 0.1 M Tris, pH 7.6, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20 (B1) containing 10% normal goat serum (NGS) for 1 hr at room temperature. Slides were incubated overnight at 4°C with anti-digoxigenin antibody conjugated with the alkaline phosphatase (1:5000; Roche Diagnostics) in B1

containing 1% NGS. After washes, the alkaline phosphatase activity was detected using nitrobluetetrazolium chloride (NBT) (337.5 $\mu\text{g/mL}$) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (175 $\mu\text{g/mL}$) (Roche Diagnostics). Sections were stained with DAPI (Invitrogen) and mounted in Mowiol (Calbiochem/Merck, Carlstadt, Germany). Control sense probe yielded no signal.

Electroretinograms (ERGs)

ERGs were recorded from male AhR^{-/-} (n=8) and AhR^{+/+} mice (n=6) aged of eight weeks. Mice were dark-adapted overnight and prepared under red dim light. Mice were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine 500 (100mg/kg, Virbac, France) and xylazine (10mg/kg, Rompun 2%, Bayer). Pupils were dilated with tropicamide eye drops (Mydriaticum 0.5%, Théa, France) and anesthetized by oxybuprocain hydrochloride solution (Théa, France) applied prior to the recordings. ERGs were recorded from both eyes simultaneously. The electroretinography equipment (SIEM Bio-Médicale, France) consisted of a Ganzfeld bowl, an amplifier (0.1 to 300 Hz) and a PC-based control (VisioSystem). Single-flash responses were obtained under dark-adapted (scotopic) and light-adapted (photopic) conditions. For the scotopic condition, five responses were averaged per light intensity with an inter-stimulus interval of 30s. Increasing white-flash stimuli ranged from 0.01 to 0.32 cd.s/m^2 . For the photopic condition, light adaptation was performed with a uniform background light (0.03 cd.s/m^2) during 5 minutes and ten responses of white-flash of 0.32 cd.s/m^2 were averaged.

Statistical analysis

Statistical processing of all results was carried out using the Statistica 7.1 software (StatSoft France). For all behavioural tests, we performed a two-way repeated measure ANOVA followed by a post-hoc Tukey analysis. For quantification of retina cells, a Friedman test was performed. The threshold for significance was set at $p < 0.05$. Reported numbers and figure error bars represent \pm standard deviations (SD).

Results

The AhR^{-/-} mice suffer from a nystagmus-like ocular instability

Because a great deal is known about the anatomy and physiology of the circuits responsible for gaze control, spontaneous and reflexive eye movements can be used to assess the integrity of many sensorimotor functions [20]. Thus, to assess potential neurological brain dysfunctions, spontaneous and reflexive eye movements were monitored in the AhR^{-/-} mice. First, video-oculography was performed in dark [14]. Figure 1A presents the eye position in horizontal and in vertical plans in the absence of head movements (spontaneous eye movements). As animals are quietly seated in dark, the eyes of wild-type mice (AhR^{+/+}) and heterozygous mice (AhR^{+/-}, not shown) remain stable. In contrast, the gaze of AhR^{-/-} mice is unstable at rest, as revealed by the presence of a spontaneous horizontal movement observed in all animals (n=12) (Figure 1B). This ocular instability affects both eyes and is also observed in the light. It consists in rhythmic sinusoidal, purely horizontal eye movements. The frequency of the ocular instability varies from 0.5 to 5 Hz depending on each individual AhR^{-/-} mouse (mean in dark=1.84±0.74 Hz; figure 1B with two examples: 0.5 Hz, upper panel to 2.8 Hz, lower panel; note absence of vertical movement) and varies with the lighting condition: indeed, we systematically measured the frequency of the eye oscillation for each mice (n=12) in the dark and in the light (Fig 1C). For a majority of individuals (n=8; equation: $y=0.94+0.34x$, $r^2=0.5089$; ANCOVA $F(1,22)=9.41$, $p<0.01$), the frequency of the nystagmus in the light is higher. This last observation is commonly observed with congenital nystagmus in humans, as the nystagmus increases when the patient tries to fixate an object.

We also performed the experiment with female mice (n=4) and identified a horizontal pendular nystagmus, similar to the one reported in males (not shown); the deficit is therefore not gender related. In addition, recordings obtained with 2 males tested at different ages (Figure S1) suggested that the nystagmus is present and evolves throughout the lifespan of the animals (pendular nystagmus to jerk nystagmus). Overall, the presence of a spontaneous nystagmus in mice of different ages and gender, demonstrates that the AhR^{-/-} mice consistently suffer from impairment in gaze control.

Assessment of the vestibulo-ocular reflex

Typically, spontaneous nystagmus can be of visual and/or vestibular origins. To explore the putative vestibular origin of the pendular nystagmus, we tested the functional integrity of the vestibulo-ocular reflex (VOR) of the AhR^{-/-} mice (Figure 2). Sinusoidal rotations of AhR^{+/+} (Figure 2A, left panel) and AhR^{+/-} mice (not shown) in the dark leads to a typical stabilization of the eye movements as compensatory slow phases interrupted by quick-phases that re-center the eye in the orbit (Figure 2A). In contrast, in AhR^{-/-} mice (Figure 2A, right panel), the spontaneous nystagmus overlaps with the former described pattern (Figure 2A, upper panel). Interestingly, at higher frequencies (above 1 Hz), the vestibular reflex dominates the spontaneous instability of the eye, which leads to a response qualitatively equivalent to the one measured in the AhR^{+/+} mice (Figure 2A, left and lower panel).

It should be noted that for the AhR^{-/-}, the nystagmus frequency is in range or close to the range of the table frequencies tested, which makes it impossible to discriminate if the eye movement is caused by the nystagmus or in response to the head movement. We measured the amplitude (gain, i.e the ratio between the eye velocity and the head stimulation velocity, see methods) and timing (phase, i.e the synchrony between the head movement and the reflexive eye velocity, see methods) of the eye movement evoked during rotation of the table. At low frequencies (0.2 and 0.5Hz), the VOR dark gain of the AhR^{-/-} is significantly lower than in controls, most probably because at these intensities, the nystagmus largely dominates the reflexive eye movements ($F(2,25)=10.7$, $p<0.001$) (Figure 2B). The phase of the reflex was also found abnormal at 0.5 and 1 Hz in the AhR^{-/-} mice (Figure 2C) with also a significant effect of the genotype ($F(2,25)=17.47$, $p<0.001$). Those defects were not apparent at higher frequencies (2Hz), where both amplitude and phase were normal compared to controls. Overall, gaze stabilization was therefore found to be impaired at frequencies up to 1Hz.

These observations indicate that the congenital nystagmus observed in AhR^{-/-} mice impaired gaze stabilization as long as the head movement was of mild intensity; however, the vestibular stimulation triggered by head movements of higher intensity led to a normal compensatory eye movement and a proper gaze stabilization. Our interpretation is that despite the obvious impairment in gaze stabilization caused by the nystagmus, the 3 neurons-arc which constitutes the basic circuitry underlying the vestibulo-ocular reflex is functional and probably not directly affected by the AhR defect. Together with the absence of obvious deficits in postural control (data not shown), these results suggest that the nystagmus of AhR^{-/-} mice is unlikely to be of purely vestibular origin.

Assessment of cerebellum integrity and function

The cerebellum plays a central role in gaze stabilizing reflexes, and in particular is part of the pathway involved in the OKR and in the tuning of the VOR. Cerebellar deficits are commonly accompanied by nystagmus [21,22]. In addition, AhR mRNA was reported in the cerebellum of mammals [23]. We therefore explored the integrity and the function of the cerebellum in the AhR^{-/-} mice. First, the overall cerebellar morphology in the AhR^{-/-} mice was characterized. CaBP staining reveals similar cerebellar morphologies in the AhR^{-/-} mice compared to AhR^{+/+} mice (Figure 3A). In both cases, the cerebellum has a normal foliation pattern and cytoarchitecture: the Purkinje cells (characterized by CaBP staining) are organized in regular rows and the climbing fibers (characterized by VGLUT2 staining) properly innervate the Purkinje cells (Figure 3A).

While being normally structured, the cerebellum might still present defective functions. In response to a visuo-vestibular conflict, the cerebellum is known to play a central role in the gain-down adaptation of the VOR [24]. Figure 3B shows that the amplitude of the 0.5Hz VOR of AhR^{+/+} mice is adapted while the animals are exposed to the visual-vestibular conflict, from 0.90 ± 0.06 to 0.60 ± 0.09 after 45 minutes of adaptation. In the AhR^{-/-} mice, the VOR gain also significantly decreases from 0.95 ± 0.04 down to 0.70 ± 0.04 (adaptation: $F(4,36)=8.4537$, $p<0.001$). In all conditions, the VOR phase is however significantly different between both AhR^{+/+} and AhR^{-/-} mice ($F(1,9)=34.109$, $p<0.001$), but this

difference relates to the genotype, and is not specific to the adaptation. These results suggest that the AhR^{-/-} mice are capable of adaptation and rule out major functional cerebellum-related deficit.

Assessment of the optokinetic reflex:

To assess the integrity of the visual pathway, we then tested the optokinetic reflex (OKR), a purely visual gaze-stabilizing reflex, by rotating the mouse at a constant velocity (5°/sec) in the light (full field OKR). The recording of the eye movements of both AhR^{+/+} and AhR^{-/-} mice is illustrated in the figure 4A. In response to optokinetic stimulation, the recording of the horizontal eye movements of the AhR^{+/+} mice (similar to the AhR^{+/-} mice) shows a classical pattern of slow phases all directed in compensatory direction (same as visual stimulation). In contrast, the pattern recorded in the AhR^{-/-} mice is perturbed by the presence of the spontaneous nystagmus superimposed to the optokinetic response.

We then quantified the gain of the OKR by measuring the dominant eye velocity trend (see methods, dotted line represented in figure 4A). Figure 4B shows for the AhR^{-/-} mice, that it is significantly decreased compared to AhR^{+/+} controls ($F(1,36)=11.362$, $p<0.01$), which suggests that the OKR circuitry is affected by the mutation.

In conclusion, functional tests of gaze stabilizing reflex suggest that the nystagmus observed in AhR^{-/-} mice would be compatible with the presence of visual or visuo-motor defects, while it unlikely reflects vestibular-specific or cerebellar-specific deficits. The cellular basis underlying the nystagmus is further addressed in the discussion.

A role for the AhR in retina during development

The presence of a congenital nystagmus in the AhR^{-/-} mice and the deficit in the OKR reflex suggest that the AhR might play a developmental function in the visuo-motor system. Therefore, *in situ* hybridization was performed to characterize the expression of the AhR in wild-type embryos at 12 and 14 days of development (Figure 5A: E12; figure 5B: E14) and focused on the eye, brainstem and cerebellum where most of OKR-related structures are found. Interestingly, the AhR is expressed in the retinal ganglion cells (RGCs) at E14, but not present at E12. On the other hand, no trace of the AhR mRNA was found in the brainstem oculomotor-related nuclei or in the cerebellum (data not shown). In the AhR^{-/-} mice, no expression of AhR was detected (Figure 5C: E12; figure 5D: E14). The developmental expression of the AhR in the sensory cells responsible for the OKR would be compatible with the presence of a congenital nystagmus of visual origin. Together with the influence of light on the nystagmus and with the decrease in the OKR efficiency, these results point toward a role of the AhR in the development of the visuo-motor system.

To further address the cellular origin of the deficit, we investigated the histology of the retina in the AhR^{-/-} mice using immunohistochemistry. We quantified the number of cells in the retina of adult AhR^{-/-} mice (n=4) and AhR^{+/+} mice (n=4). Altogether, we found no quantitative difference between the number of retinal cells found in the AhR^{-/-} and AhR^{+/+} mice (figure 6, bottom panels). However, we observed a disorganization of the synapses between the bipolar cells and the RGCs in the AhR^{-/-}

mice (Figure 6, see the arrows in the bottom panel corresponding to the staining of PKCa in the AhR^{-/-} mice); in the AhR^{+/+} mice, the distribution of the bipolar projections onto the RCGs dendrites was found to be lamina-restricted (Upper panel, PKCa staining) while these projections in the AhR^{-/-} mice, were scattered with the axons of the bipolar cells disseminated throughout the IPL of the retina.

To assess the function of the retinal cells, electrophysiological testing was performed using electroretinography. During a scotopic stimulation AhR^{+/+} response consisted of typical first negative a-wave followed by a positive b-wave (AhR^{+/+} mice on the left of figure 7A left traces). Responses observed in AhR^{-/-} mice were similar to those of AhR^{+/+} (Figure 7A right traces). Quantification revealed no statistical difference between the two genotypes (Figure 7A bottom panels).

The photopic ERG wave amplitudes, reflecting cone function were also recorded after 5 minutes of light adaptation (Figure 7B). There was no significant difference of the photopic b-wave between the adult AhR^{-/-} and AhR^{+/+} mice.

Altogether, our results demonstrate that the nystagmus observed in the AhR^{-/-} mice is not related to a major histological or functional impairment of the retinal cells. However, decrease in optokinetic reflex, influence of light on the nystagmus, developmental expression of AhR in the retina and the observed disorganization of retinal cell layers all suggest that the nystagmus is likely of visual or visuo-motor origin.

Exposure of adult mice to an exogenous AhR ligand, TCDD, does not induce a pendular nystagmus

Finally, several recent reports suggest that exogenous AhR ligands might disrupt the endogenous function of the receptor. Sartor and colleagues reported in a hepatic cell line Hepa1c1c7 that the AhR binds different xenobiotic responsive elements with or without TCDD [25]. This phenomenon might be responsible for unpredicted toxicities. As a consequence, the disruption of the AhR functions through either the binding to exogenous ligands or genetic deletion could result in comparable phenotypes.

To test this hypothesis, we treated adult AhR^{+/+} mice (10 weeks) with TCDD, an exogenous ligand of the AhR, and measured several visuo-motor parameters as in the AhR^{-/-} mice; we performed a subchronic treatment with 25 μ g/kg of TCDD (or corn oil, as sham control), once a week during 5 weeks and daily observed the spontaneous eye movements (Figure S2). After 5 weeks of treatment, we did not observe any abnormal eyes movements, i.e no nystagmus was present, suggesting that in adult mice TCDD does not alter the putative physiological functions of the AhR related to the regulation of the gaze stabilizing homeostasis.

Discussion and conclusion

Evidence for an endogenous role of AHR in CNS development

Several studies investigated the effect of TCDD, the AhR ligand, on the brain development. TCDD exposure disrupts different cellular processes in neurons and glial cells such as apoptosis, proliferation and differentiation. For example, TCDD leads to an increase of apoptosis in granule neuron precursor cells [26] and in cortical neurons [6]. Moreover, using telencephalon tissues in E13.5 mice, Gohlke and colleagues suggested a disruption of the differentiation of GABAergic neurons in the ventral telencephalon in TCDD-treated WT mice and in non-treated AhR^{-/-} mice [27].

Previous studies have suggested that the AhR plays a significant role in neuronal development and in neural functions in invertebrates. Interestingly, in *C.elegans*, the AhR plays a crucial role in the development of the fate of GABAergic neurons [10]. Based on these results, it is tempting to speculate that AHR endogenous functions in the CNS could have been conserved in vertebrates. Then, the binding of TCDD on the AhR could lead to a disruption of the endogenous functions of this receptor.

Very few studies have been performed using vertebrate models on the role of the AhR in the nervous system. It was suggested that the AhR could play an endogenous role in the neural biology [27]. Indeed, Lin et al., which used primary cortical neurons of rats, showed that a knockdown of AhR by siRNA experiments protects neurons against NMDA-mediated excitotoxicity [28]. The knockdown of the AhR induced a reduction of the NMDA-induced $[Ca^{2+}]_i$ influx due to a decreased expression of subunits of NMDA receptors. Still at the cellular level, the AhR also seems to be important for cell differentiation. The overexpression of the AhR in the murine Neuro2 cell line induces an outgrowth of the neuritis [29], which is also induced by treatment with TCDD, in granule neuroblast cells [8]. So far however, no study reported behavioural impairments in relation to AhR perturbation.

Nystagmus: comparison with human pathologies.

In our study, we showed that the AhR^{-/-} mice suffer from a horizontal pendular nystagmus whose molecular mechanisms are not yet characterized. In humans, congenital nystagmus (or as reported by the Committee for the classification of Eye Movement Abnormalities and Strabismus: infantile nystagmus syndrome, INS) is characterized by conjugated involuntary oscillations of both eyes, which appear at birth or during early infancy. INS as a prevalence of about 1/1000 to 1/6000 (Abadi and Bjerre) is predominantly horizontal and often characterized by pendular waveforms in the 0.5-8Hz range, which can evolve with age in jerk movements. The nystagmus also increases with fixation attempt. The eye movement disorder we report in the AhR^{-/-} mice shares many features with INS in humans. Hence, it appeared early in the animal development (<4weeks), was conjugated and predominantly horizontal. In addition as in humans, we report an evolution with age from pendular to jerk-like movements (supplementary figure S1). Mouse nystagmus was also greater at light than in the dark, a symptom, which resembles INS during fixation. Interestingly, zebrafish and sheepdogs were for long the only animal models used in INS research but their nystagmus is not persistent under

obscurity [30]. Recently, albino mice were proposed as a model for INS [31]. Melanin synthesis disorders have long been linked to visual and visuo-motor impairments and undoubtedly constitute an interesting model for INS in albinos patients (~25% of INS patients; [32]). The AhR^{-/-} mouse is complementary to these models and shows some unique features, which might be relevant to perform additional works that cannot be realized with other albino strains of mice or other animal models. Given the many common features between the AhR mouse and human INS, it would be interesting to characterize if the other strains of AhR^{-/-} mice generated independently (whose phenotypes sometimes diverge) [4,5], display a nystagmus.

Structure and systems potentially implicated in nystagmus of visual or visuo-motor origin:

The functional deficit observed in the optokinetic reflex suggests that the pendular nystagmus observed in AhR^{-/-} is likely of visuo-motor origin. The circuitry of the optokinetic system involves the retina, the afferent visual pathway, the accessory optic system, inferior olivary and cerebellum, many brainstem oculomotor-related nuclei, oculomotor nerves (III et VI for horizontal movement) and the extra-ocular muscles [33].

Congenital nystagmus is often associated to a decrease of visual acuity or retinal impairments. For instance, it may be due to a loss of photoreceptors like in the Leber's congenital amaurosis (LCA) [34]. Interestingly, mutations of AIPL1 (AhR interacting protein like-1), which shares 49% identity and 69% similarity with the human AIP (AhR interacting protein), was identified as a cause for this inherited disease [35]. Our results suggest that AhR^{-/-} mice do not suffer from a loss of retinal cells, or of photoreceptor as in LCA. We have however identified a disorganization of lamina-restricted connections between bipolar axons and RGCs dendrites, but ERG didn't reveal any functional deficit in the retina, suggesting that the basic physiology of the retinal cells and circuitry might be preserved. Whether this disorganization of retina cell layers relates to the transitory expression of the AhR during development, the origin of the optokinetic reflex deficit and congenital nystagmus is currently unknown and will be the topic of future investigations.

Finally, specific functional test of visual acuity in AhR^{-/-} mice will be needed to distinguish between a purely visual or visuo-motor origin of the nystagmus. Hence, congenital nystagmus is most probably multifactorial, and other defects downstream of the retina could be implicated in both OKR deficit and nystagmus. The electrophysiological investigation of structures such as the NOT (Nucleus Optic Tract), inferior olivary nucleus, abducens and oculomotor nuclei, will likely be needed in order to functionally trace the neuronal origin(s) of the spontaneous nystagmus in the AhR^{-/-} mice.

Toxicological activation of AHR and myelination:

Nystagmus are often found in myelin disorders [36,37]. It was recently demonstrated that the treatment of rats by TCDD during gestation altered the expression of genes involved in the myelin, suggesting that activation of the AhR by exogenous ligands might lead to disruption of myelin

homeostasis [38]. Future experiments focusing on the myelination of the AhR^{-/-} brain will explore this hypothesis.

Finally, treatment with TCDD might be also interesting to test the hypothesis of an endogenous disruption of the normal functions of the receptor. We already demonstrated that AhR^{+/+} mice treated by high doses of TCDD during 6 weeks do not exhibit an ocular instability. However, It will be interesting to treat pregnant mice to assess the consequences of TCDD exposure on the developing brain and grown behavior of the pups.

Conclusion

In conclusion, our study demonstrates a new endogenous role of the AhR in the homeostasis of the developing nervous system. To our knowledge, no mouse model of congenital nystagmus has been reported so far. Future work on the AhR^{-/-} mice will help to better understand the developmental mechanisms underlying congenital nystagmus.

Acknowledgments:

This work was funded by the CNES (Centre National d'Etudes Spatiales); CNRS (Centre National de Recherche Scientifique); INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale); the MESR (Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche; Bourse doctorale, Aline Chevallier); the Université Paris Descartes. We thank Dr. Erwin Idoux, Dr Alain Chedotal and Dr Francesco Baoto (Institut de la vision) for their technical help and advices. We thank Manuel Simonutti and Julie Dergardin for their help with electroretinography experiments.

1. Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A (2004) The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 189-204.
2. Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM (2007) The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett* 581: 3608-3615.
3. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, et al. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268: 722-726.
4. Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6731-6736.
5. Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, et al. (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2: 645-654.
6. Lin CH, Juan SH, Wang CY, Sun YY, Chou CM, et al. (2008) Neuronal activity enhances aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression and dioxin neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurochem* 104: 1415-1429.
7. Petersen SL, Curran MA, Marconi SA, Carpenter CD, Lubbers LS, et al. (2000) Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem. *J Comp Neurol* 427: 428-439.
8. Collins LL, Williamson MA, Thompson BD, Dever DP, Gasiewicz TA, et al. (2008) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure disrupts granule neuron precursor maturation in the developing mouse cerebellum. *Toxicol Sci* 103: 125-136.
9. Butler RA, Kelley ML, Powell WH, Hahn ME, Van Beneden RJ (2001) An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. *Gene* 278: 223-234.
10. Huang X, Powell-Coffman JA, Jin Y (2004) The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*. *Development* 131: 819-828.
11. Emmons RB, Duncan D, Estes PA, Kiefel P, Mosher JT, et al. (1999) The spineless-aristopedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila*. *Development* 126: 3937-3945.
12. Kim MD, Jan LY, Jan YN (2006) The bHLH-PAS protein Spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of *Drosophila* dendritic arborization neurons. *Genes Dev* 20: 2806-2819.
13. Hahn ME (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141: 131-160.
14. Beraneck M, Cullen KE (2007) Activity of vestibular nuclei neurons during vestibular and optokinetic stimulation in the alert mouse. *J Neurophysiol* 98: 1549-1565.
15. Oommen BS, Stahl JS (2008) Eye orientation during static tilts and its relationship to spontaneous head pitch in the laboratory mouse. *Brain Res* 1193: 57-66.
16. Beraneck M, McKee JL, Aleisa M, Cullen KE (2008) Asymmetric recovery in cerebellar-deficient mice following unilateral labyrinthectomy. *J Neurophysiol* 100: 945-958.

17. Calabrese DR, Hullar TE (2006) Planar relationships of the semicircular canals in two strains of mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 7: 151-159.
18. Iwashita M, Kanai R, Funabiki K, Matsuda K, Hirano T (2001) Dynamic properties, interactions and adaptive modifications of vestibulo-ocular reflex and optokinetic response in mice. *Neurosci Res* 39: 299-311.
19. van Alphen B, Winkelman BH, Frens MA (2010) Three-dimensional optokinetic eye movements in the C57BL/6J mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 623-630.
20. Stahl JS (2004) Using eye movements to assess brain function in mice. *Vision Res* 44: 3401-3410.
21. Strupp M, Hufner K, Sandmann R, Zwergal A, Dieterich M, et al. (2011) Central oculomotor disturbances and nystagmus: a window into the brainstem and cerebellum. *Dtsch Arztebl Int* 108: 197-204.
22. Hufner K, Stephan T, Flanagan VL, Deutschlander A, Dera T, et al. (2011) Cerebellar and visual gray matter brain volume increases in congenital nystagmus. *Front Neurol* 2: 60.
23. Williamson MA, Gasiewicz TA, Opanashuk LA (2005) Aryl hydrocarbon receptor expression and activity in cerebellar granule neuroblasts: implications for development and dioxin neurotoxicity. *Toxicol Sci* 83: 340-348.
24. Boyden ES, Raymond JL (2003) Active reversal of motor memories reveals rules governing memory encoding. *Neuron* 39: 1031-1042.
25. Sartor MA, Schnekenburger M, Marlowe JL, Reichard JF, Wang Y, et al. (2009) Genomewide analysis of aryl hydrocarbon receptor binding targets reveals an extensive array of gene clusters that control morphogenetic and developmental programs. *Environ Health Perspect* 117: 1139-1146.
26. Sanchez-Martin FJ, Fernandez-Salguero PM, Merino JM (2011) Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse. *J Neurochem* 118: 153-162.
27. Gohlke JM, Stockton PS, Sieber S, Foley J, Portier CJ (2009) AhR-mediated gene expression in the developing mouse telencephalon. *Reprod Toxicol* 28: 321-328.
28. Lin CH, Chen CC, Chou CM, Wang CY, Hung CC, et al. (2009) Knockdown of the aryl hydrocarbon receptor attenuates excitotoxicity and enhances NMDA-induced BDNF expression in cortical neurons. *J Neurochem* 111: 777-789.
29. Akahoshi E, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M (2006) Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study. *Environ Health* 5: 24.
30. Huang MY, Chen CC, Huber-Reggi SP, Neuhauss SC, Straumann D (2011) Comparison of infantile nystagmus syndrome in achiasmatic zebrafish and humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1233: 285-291.
31. Traber GL, Chen CC, Huang YY, Spoor M, Roos J, et al. (2012) Albino mice as an animal model for infantile nystagmus syndrome. *Investigative ophthalmology & visual science* 53: 5737-5747.
32. Abadi RV, Bjerre A (2002) Motor and sensory characteristics of infantile nystagmus. *The British journal of ophthalmology* 86: 1152-1160.
33. Buttner U, Buttner-Ennever JA (1988) Present concepts of oculomotor organization. *Reviews of oculomotor research* 2: 3-32.
34. Tan MH, Mackay DS, Cowing J, Tran HV, Smith AJ, et al. (2012) Leber congenital amaurosis associated with AIPL1: challenges in ascribing disease causation, clinical findings, and implications for gene therapy. *PLoS One* 7: e32330.

35. van der Spuy J, Cheetham ME (2004) The Leber congenital amaurosis protein AIPL1 modulates the nuclear translocation of NUB1 and suppresses inclusion formation by NUB1 fragments. *The Journal of biological chemistry* 279: 48038-48047.
36. McLean RJ, Gottlob I (2009) The pharmacological treatment of nystagmus: a review. *Expert Opin Pharmacother* 10: 1805-1816.
37. Frohman EM, Frohman TC, Zee DS, McColl R, Galetta S (2005) The neuro-ophthalmology of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4: 111-121.
38. Fernandez M, Paradisi M, D'Intino G, Del Vecchio G, Sivilia S, et al. (2010) A single prenatal exposure to the endocrine disruptor 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters developmental myelination and remyelination potential in the rat brain. *J Neurochem* 115: 897-909.

Figure

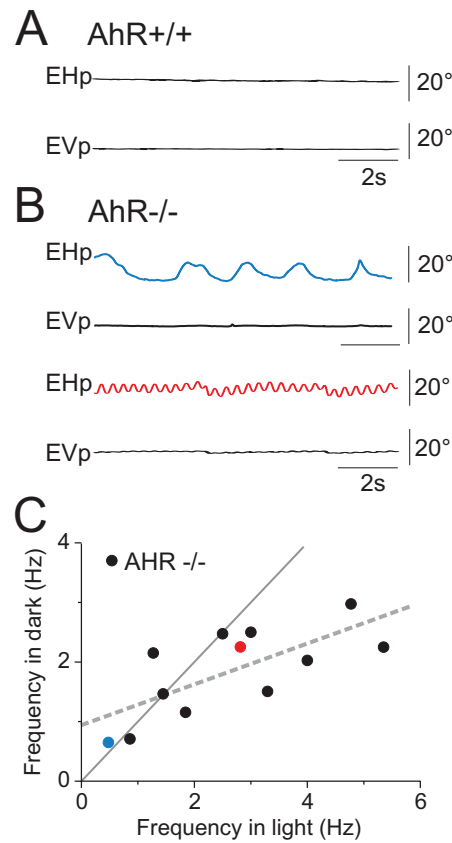


Figure 1: AhR^{-/-} mice have a horizontal pendular nystagmus

(A) Positions of the eyes of the AhR^{+/+} mice in both horizontal (EHp) and vertical (EVp) plans in the absence of head movements in the dark. (B) Positions of the eyes of 2 different AhR^{-/-} mice showing spontaneous nystagmus at low frequency in light (upper) and at high frequency in dark (bottom). The AhR^{-/-} mice have an ocular instability exclusively in the horizontal plan whereas the eyes of AhR^{+/+} mice and AhR^{+/-} mice are stable. (C) Frequencies of the nystagmus in light and dark conditions for each AhR^{-/-} mouse (n=12). The linear regression is represented by the dotted line in grey. EHp: Eye Horizontal position; EVp: Eye vertical position. In this and all following figures, eye movements to the right are presented upward.

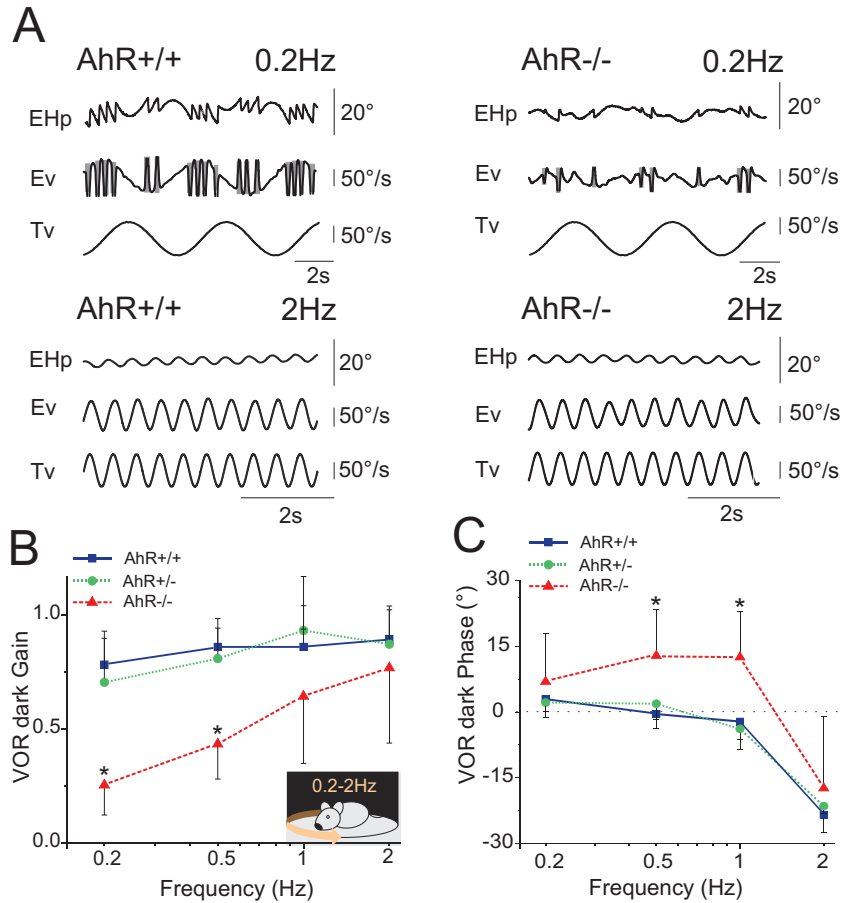


Figure 2: Normal vestibular function in AhR-/- mice

(A) Example of eye movements evoked in AhR+/+ (*left*) and AhR-/- (*right*) during sinusoidal oscillation in the horizontal plan at a peak velocity of 50°/s. *top*: frequency of the oscillation equal to 0.2Hz; *bottom*: frequency of 2Hz. Shaded areas indicate quick phases. At low frequency, the nystagmus overlaps the normal VOR pattern. At high frequency, both AhR+/+ and AhR-/- mice show comparable reflexive eye movements. (B-C), Gain (B) and phase (C) of the VOR in the dark. Blue lines correspond to the AhR+/+ mice, green lines correspond to the AhR+/- mice and red lines correspond to the AhR-/- mice. At low frequency, the VOR gain and phase in the AhR-/- mice decreased compared to the AhR+/+ mice. At high frequency, VOR gain and phase did not differ from that of other groups suggesting that the vestibulo-ocular reflex is not affected in the AhR-/- mice

Asterisk indicates statistical difference with $p < 0.05$, EHp, Eye Horizontal position; EVp, Eye Vertical position; Ev, Eye velocity; Tv, Table velocity. In this and all following figures: head velocity traces have been inverted to facilitate comparison with eye velocities; the phase lead is positive (up); plots present mean \pm Standard Deviation (SD).

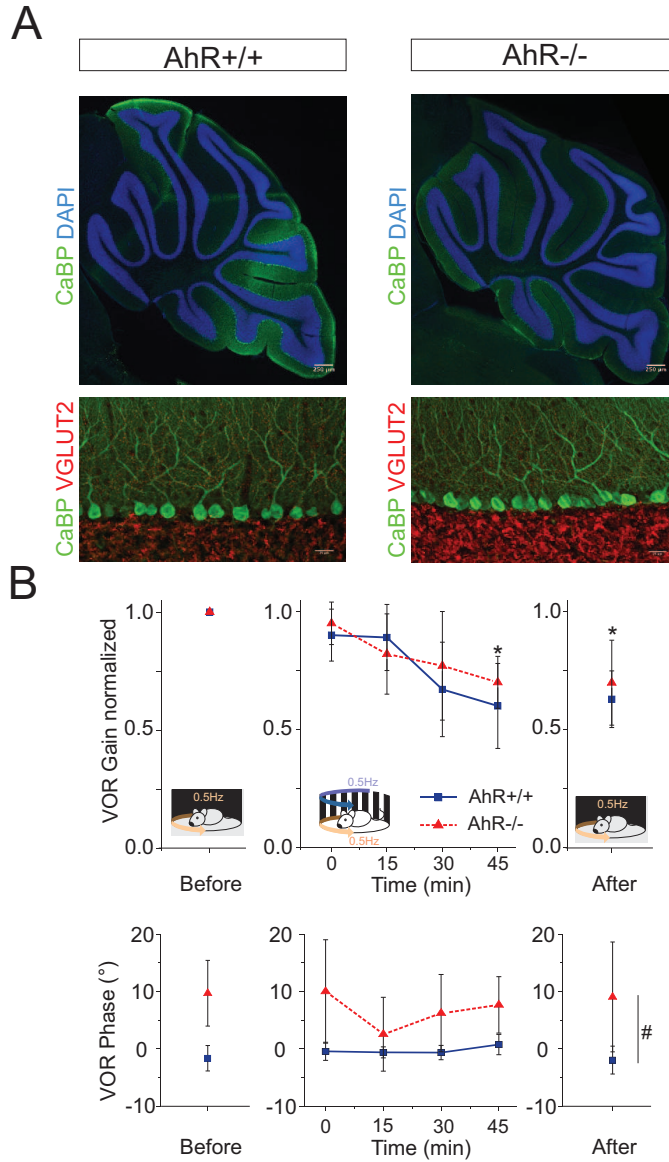


Figure 3: Cerebellar morphology and function are not affected by the AhR invalidation

(A) The morphology of the cerebellum in both AhR+/+ (*left*) and AhR-/- mice (*right*) is similar. *Top*: The size of the cerebellum and its foliation are normal in AhR-/-, as shown on sagittal sections labeled with anti-calbindin antibodies and counterstained with DAPI. *Bottom*: Climbing fibers (stained by VGLUT2) properly innervate the dendritic arborization of Purkinje cells (CaBP). Scale bars represent 250 μ m (*top*) and 25 μ m (*bottom*). (B-C) Normalized gain (C) and phase (D) during the visuo-vestibular conflict at 0.5Hz. The AhR-/- and AhR+/+ mice are capable of adaptation during and after the vestibulo-ocular conflict. Blue lines correspond to the AhR+/+ mice, and red lines correspond to the AhR-/- mice. Asterisk indicates statistical difference between the VOR gain before and after the conflict with $p < 0.001$, # represent the statistical difference between the VOR phase during all the adaptation protocol with $p < 0.001$.

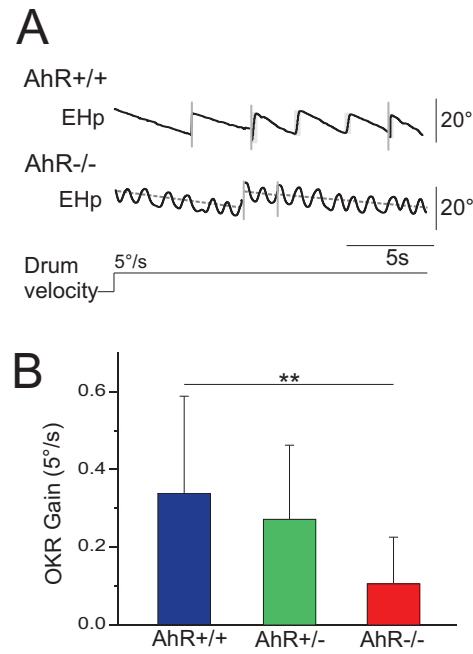


Figure 4: The OKR of AhR-/- mice is decreased

(A) Example of eye movements evoked in both AhR+/+ and AhR-/- mice in horizontal position (EHp) during a rotation at 5°/sec in light in counter-clockwise. (B) OKR gain at 5°/sec. The OKR gain is significantly decreased in the AhR-/- mice compared with AhR+/+ mice. The figure presents discontinuous time, as indicated by the vertical lines. Asterisk indicates statistical difference with $p < 0.01$, EHp: Eye Horizontal position.

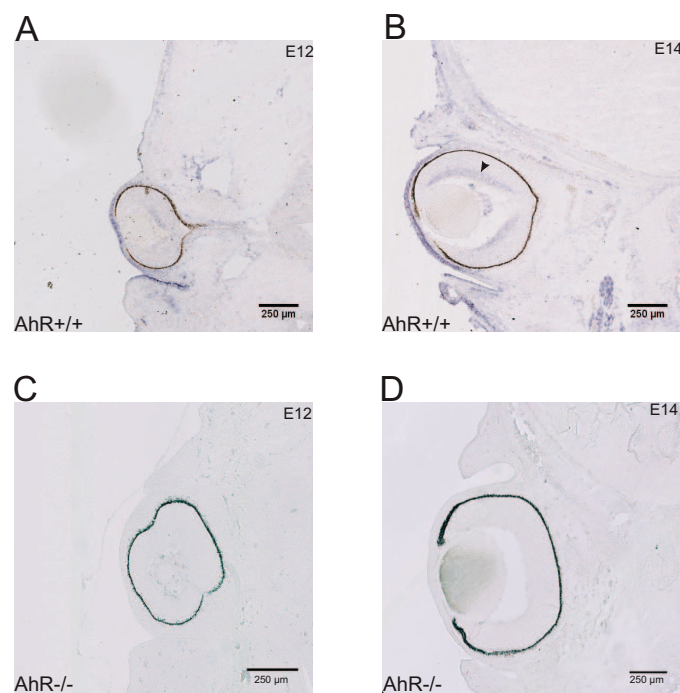


Figure 5: The AhR is expressed in the eyes during the development of AhR+/+ mice

In situ hybridization is performed on coronal sections of the mice eyes at two embryonic stages (E12 and E14) with digoxigenin-labeled riboprobes for AhR. (A & C) E12 coronal section of AhR+/+ (A) and AhR-/- mice (C); no expression of AhR is detected at this stage. (B & D) E14 coronal section of AhR+/+ (B) and AhR-/- mice (D); the black arrow (in B) indicates the expression of AhR in the retinal ganglion cells. Scale bar represent 250μm.

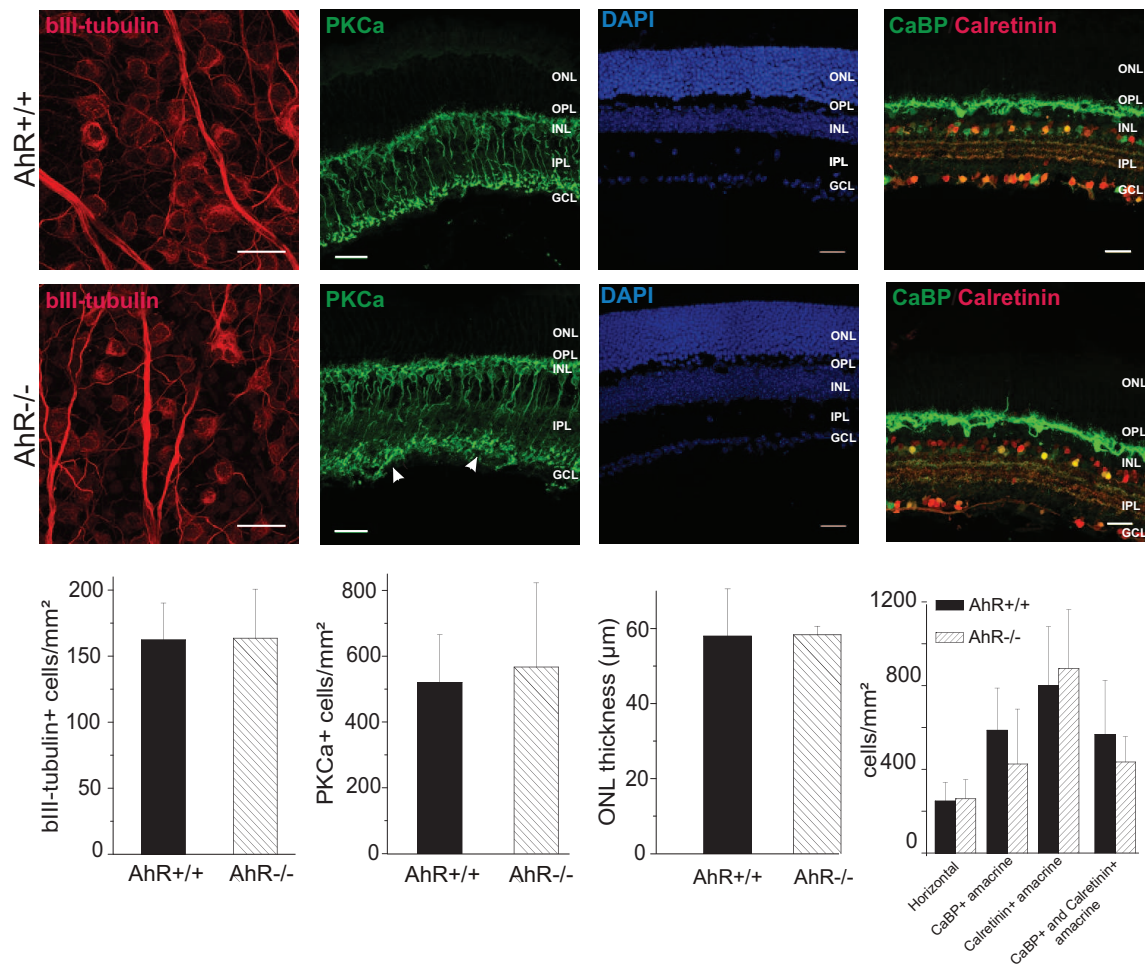


Figure 6: AhR^{-/-} mice retinal cells are functional despite scattered bipolar to RGC connections.

Immunohistochemistry experiments were performed in retina sections of adult AhR^{+/+} and AhR^{-/-} mice. AhR^{+/+} and AhR^{-/-} retina at P56 is represented. Retinal ganglion cells (RGC) are labeled with antibodies against β III-tubulin; bipolar cells are labeled with antibodies against PKC α (Protein Kinase C α), nucleus is labeled with DAPI; amacrine and displaced amacrine cells are labeled with both antibodies against calbindin (CaBP)-D28k and calretinin. Horizontal cells are stained with antibodies against calbindin. The density of RGC, bipolar, amacrine and displaced amacrine, and horizontal cells are not significant different between AhR^{+/+} and AhR^{-/-} mice (see quantifications at the bottom of the figure). The thickness of the ONL is the same between both genotypes. The white arrows in the bottom panel of the PKCa staining indicate the disorganization of the synapses between the bipolar cells and the RGCs in the AhR^{-/-} mice. Scale bar = 25 μ m. ONL: Outer Nuclear Layer, INL: Inner Nuclear Layer, GCL: Ganglion Cells Layer, OPL: Outer Plexiform Layer, IPL: Inner Plexiform Layer.

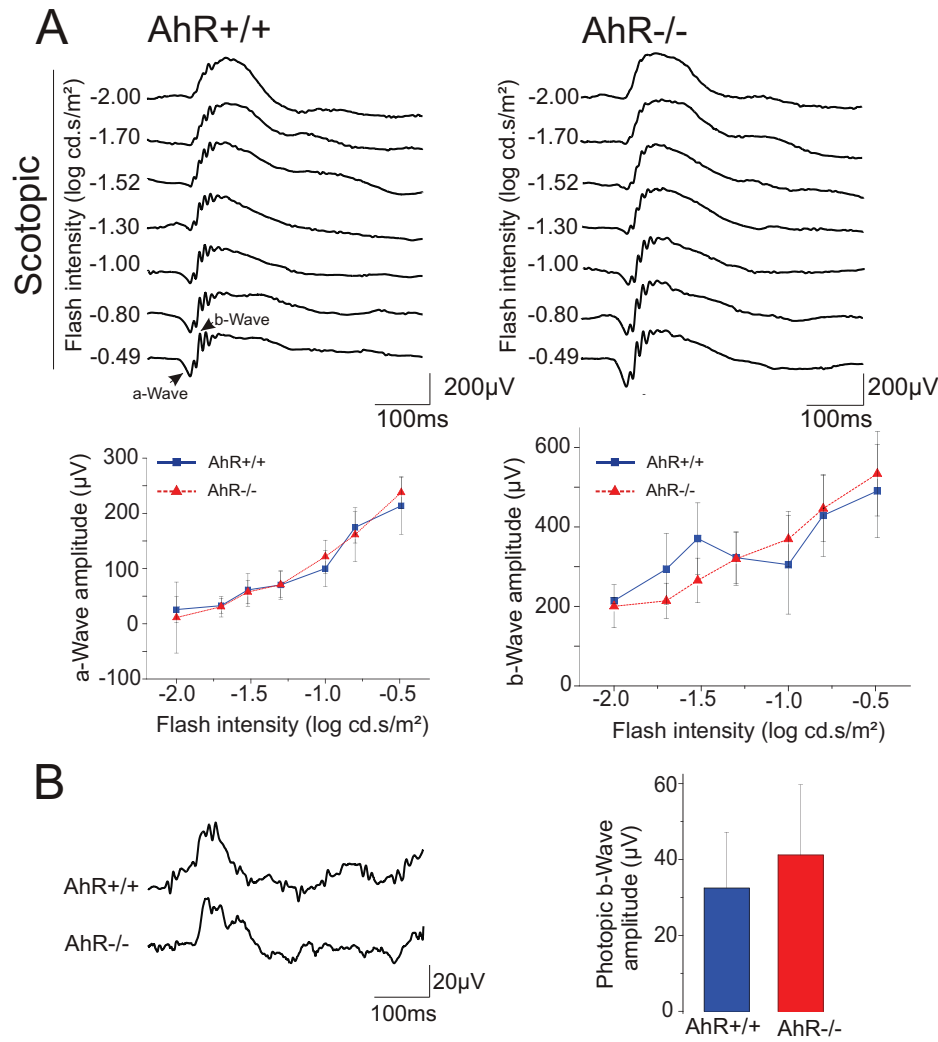


Figure 7: Electrophysiological data are normal in AhR-/- mice.

(A) Representative scotopic ERG at different light intensities (from -2 to -0.49 log cd.s/m²) in both AhR+/+ and AhR-/- mice. Quantifications of a-Wave and b-Wave amplitudes are represented in the lower panel. (B) Representative photopic ERG. The photopic response is obtained using a flash intensity to -0.49 log cd.s/m² on light-adapted mice and measured for both mice. There are no significant differences between both genotypes in scotopic and photopic ERG. Blue lines correspond to the AhR+/+ mice, and red lines correspond to the AhR-/- mice.

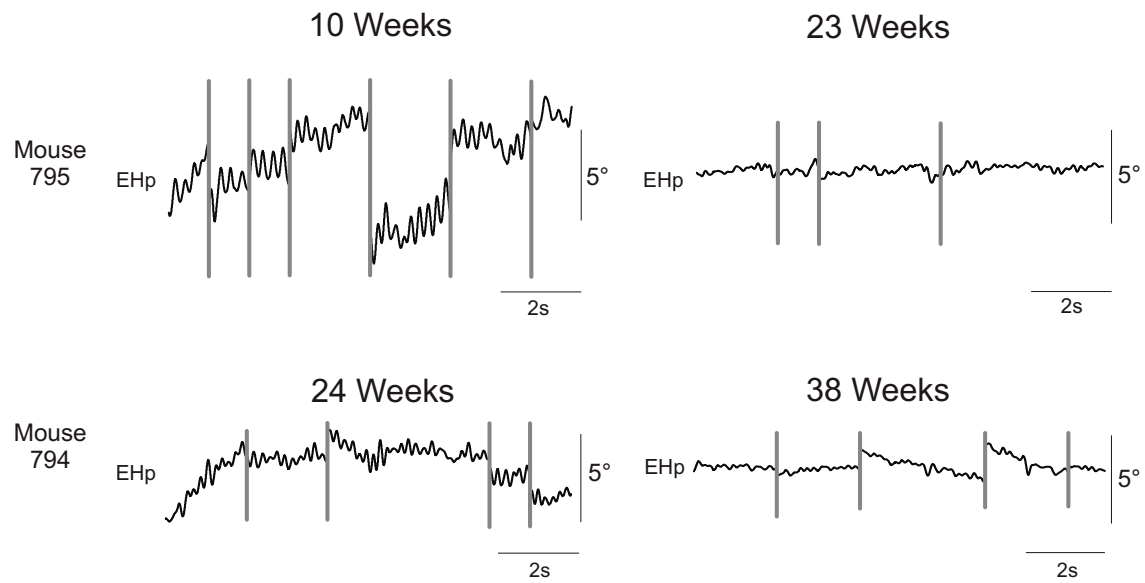


Figure S1: Evolution of the nystagmus throughout mice aging

Position of the eyes in the horizontal plan (EHP) of two AhR^{-/-} mice at different ages (10 and 23 weeks for mice 1; 24 and 38 for mice 2). The figure presents discontinuous time, as indicated by the vertical lines. EHP, Eye Horizontal position.

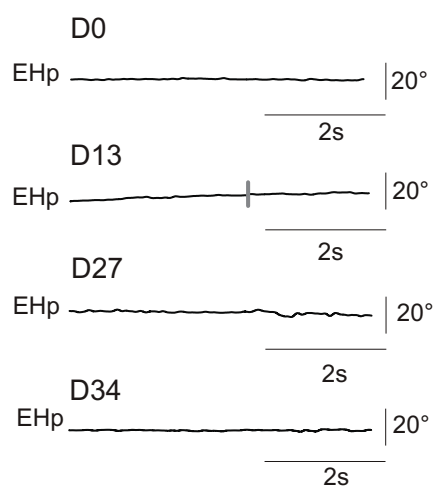


Figure S2: TCDD treatment of adult *AhR*^{+/+} mice did not affect gaze stability

Adult *AhR*^{+/+} mice were treated by 25 $\mu\text{g/kg}$ of TCDD at day 0, 7, 14, 21, 28. The mice were monitored at day 0, 13, 27, 34 (respectively D0, D13, D27, D34). Positions of the eyes in horizontal (EHP) plan in the absence of head movements in the dark are presented. The *AhR*^{+/+} mice treated by TCDD did not exhibit a horizontal pendular nystagmus. Note D13 trace shows discontinuous time, as indicated by the vertical line. EHP, Eye Horizontal position.

D. Conclusion

Notre étude a démontré que les souris AhR^{-/-} présentent une instabilité oculaire caractérisée par des mouvements spontanés des yeux, exclusivement dans le plan horizontal. Les analyses des réflexes de stabilisation du regard montrent que le VOR est efficace lorsqu'on le stimule à haute fréquence alors que l'OKR est significativement moins efficace. De plus, nos observations montrent que le cervelet des souris AhR^{-/-} a une morphologie semblable à celui des souris sauvages. Les souris déficientes pour le AhR ne présentent pas d'ataxie²⁴ et sont capables d'adaptation du VOR ce qui suggère que cette fonction du cervelet n'est pas altérée chez ces souris.

L'étude de l'expression du AhR a été réalisée afin de déterminer avec précision sa localisation tissulaire au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte. De nombreuses difficultés sont apparues. Le marquage de la protéine AhR en immunohistochimie est le même chez les souris AhR^{+/+} que chez les souris AhR^{-/-}. Ce résultat suggère que les anticorps commercialisés ne sont pas spécifiques et reconnaissent d'autres protéines; un bon candidat serait le répresseur du AhR (AhRR), protéine ubiquitaire qui possède une forte homologie de séquence avec le AhR (chapitre I-B-6-b). En conséquence, nous avons utilisé une autre technique de marquage, l'hybridation *in situ*, qui permet de détecter l'ARNm du AhR. Les sondes ont été dessinées au niveau de la partie C-terminale du AhR pour s'affranchir des fortes homologies de séquence que partagent les parties N-terminales du AHR et du AhRR. Des souris AhR^{+/+} et AhR^{-/-} de différents âges ont été utilisées :

- Embryons de 12 et 14 jours (E12.5 et E14.5)
- Souris en période néonatale (P0.5)
- Souris âgées de 10 jours et 56 jours (adulte)

Les expériences d'hybridation *in situ* démontrent l'expression du AhR dans la couche des cellules ganglionnaires de la rétine chez les embryons âgés de 14 jours. L'expression du AhR dans cette région est transitoire comme le suggère l'absence de marquage chez les souris néonatales et postnatales. L'étude de l'histologie de la rétine (quantification du nombre des principales cellules de la rétine) chez les souris adultes, a été effectuée afin de déterminer si le développement et l'architecture de la rétine ont été altérés par l'absence du AhR au cours du développement. Nous n'avons pas observé de différences du nombre de cellules ganglionnaires, amacrines, horizontales, bipolaires et des photorécepteurs entre les souris

²⁴ L'ataxie est un trouble de coordination motrice.

adultes AhR^{+/+} et AhR^{-/-}. Des électrorétinogrammes (ERG) ont également été effectués afin d'évaluer la fonction de la rétine chez les souris AhR^{-/-}. Les réponses enregistrées lors de ce test, sont identiques entre les deux génotypes de souris, ce qui suggère que la rétine ne subit pas d'altérations majeures suite à l'invalidation du AhR.

De plus, nous n'avons pas observé de marquage dans les différentes régions cérébrales et ce, quel que soit l'âge des souris. Ce résultat peut paraître contradictoire avec ceux décrits dans la littérature, mais il peut s'expliquer par la limite de sensibilité de la technique d'hybridation *in situ*. Cependant, chez l'embryon âgé de 12 et 14 jours, nous avons observé une expression du AhR au niveau des précurseurs des cellules de Schwann dans les nerfs crâniens comme les nerfs faciaux, trigéminaux, et dans les ganglions rachidiens (Figure 36).

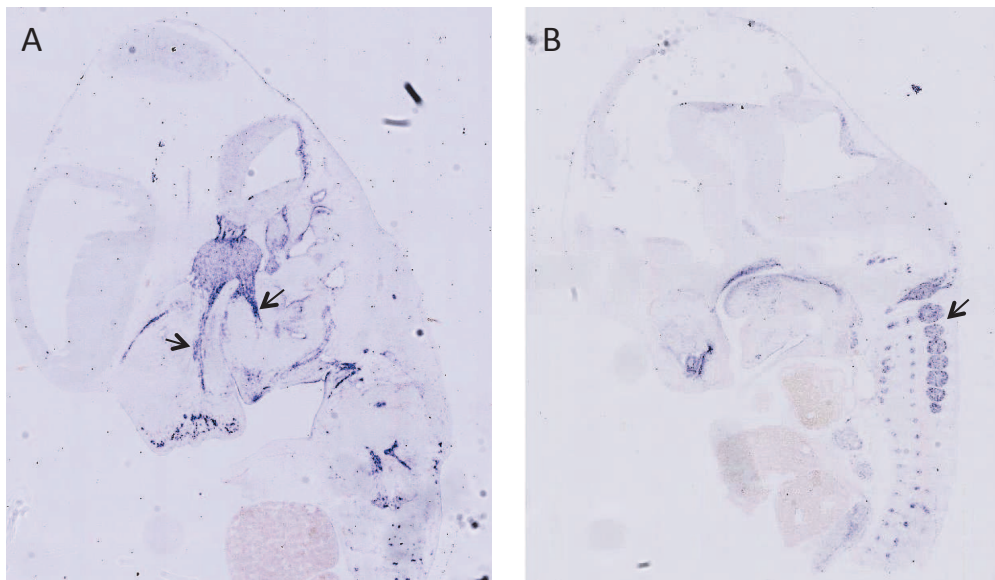


Figure 36 : Hybridation *in situ* montrant la localisation du AhR dans les embryons de souris C57BL/6J de 12 jours.

A. L'ARNm du AhR est exprimé au niveau des nerfs provenant du ganglion trigéminal (flèches) B. L'ARNm du AhR est présent dans les ganglions rachidiens (flèche).

Un co-marquage avec des marqueurs spécifiques des cellules de Schwann (SOX10, S100) est en cours de réalisation afin de confirmer cette hypothèse.

Les mécanismes moléculaires et anatomiques à l'origine du nystagmus sont encore à élucider. Nos résultats suggèrent une implication des circuits visuo-moteurs qui comprennent la rétine et les afférences du système visuel, différentes structures du tronc cérébral comme le noyau du tractus optique et le système optique accessoire, ainsi que les nerfs et muscles oculomoteurs. Le nystagmus pendulaire horizontal peut aussi être lié à un défaut de myélinisation des différents nerfs. Cette hypothèse serait en accord avec l'expression précoce

du AhR dans les précurseurs des cellules de Schwann ainsi qu'avec d'autres résultats comportementaux que j'ai obtenus chez le modèle de souris AhR^{-/-} et que je présente ci-dessous.

Nous avons réalisé des tests d'« openfield » ou test à champ ouvert et de rotarod chez les souris AhR^{+/+}, AhR^{+/-} et AhR^{-/-}. **L'openfield est un test qui met en évidence des troubles de la locomotion, de la curiosité et l'anxiété des animaux**: il consiste à placer un animal dans un environnement nouveau, ici un cube de 30 cm³ avec des murs transparents et à filmer ses déplacements à l'aide de 8 caméras placées de part et d'autre de la surface du cube. L'animal est déposé au centre du cube et ses déplacements sont filmés pendant 10 minutes. La distance parcourue, la vitesse de déplacement et le nombre de « rearings²⁵ » sont alors mesurés et quantifiés (Figure 37).

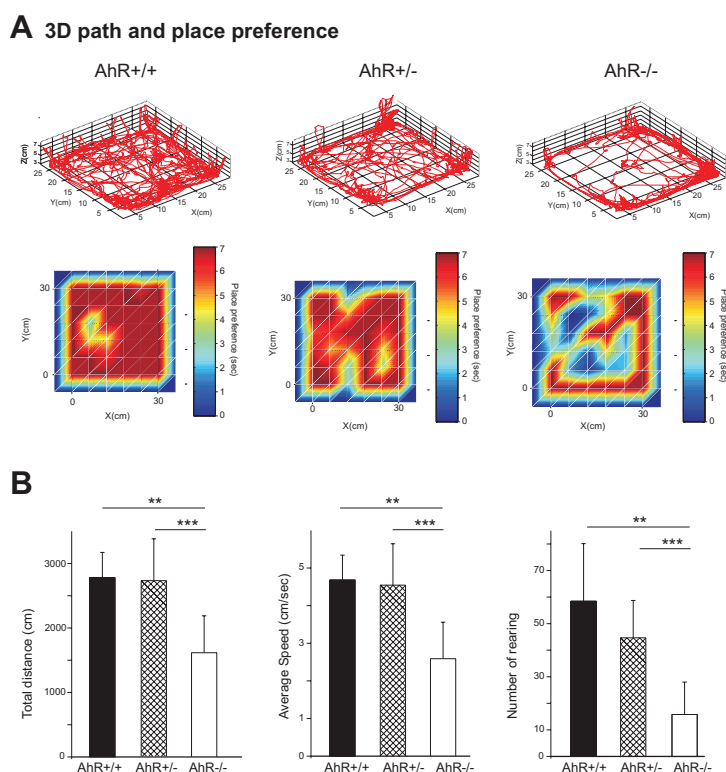


Figure 37 : Test de l'openfield.

A) Déplacement et préférence de position des souris AhR^{+/+}, AhR^{+/-} et AhR^{-/-}. Les dimensions de la surface « ouverte » sont données en X et Y (30 cm). En haut de la figure, la ligne rouge indique le déplacement de l'animal sur la période de 10 minutes. En bas, la préférence de place des souris est représentée (en bleu : aucun passage dans cette zone, en rouge passage de la souris pendant plus de 7 sec) B) De gauche à droite, distance parcourue (« total distance »), vitesse moyenne (« average speed ») des déplacements et nombre de « rearings » des différents groupes de souris. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

²⁵ Le « rearing » se caractérise par le fait que la souris se lève sur ses pattes postérieures pour observer son environnement.

Contrairement aux souris $AhR^{+/+}$ et $AhR^{+/-}$ qui explorent l'ensemble de l'espace et se déplacent au centre du cube, les souris $AhR^{-/-}$ restent cantonnées au niveau du périmètre du cube et ne se déplacent que très rarement au centre de celui-ci. De plus, la distance parcourue et la vitesse moyenne de déplacement sont significativement diminuées chez les souris $AhR^{-/-}$. Le nombre de « rearings » est également réduit : en effet, les souris $AhR^{-/-}$ se lèvent en moyenne 12 fois alors que les souris $AhR^{+/+}$ se lèvent en moyenne 60 fois au cours du test. Ces observations suggèrent que les souris $AhR^{-/-}$ ont des problèmes de locomotion et/ou d'anxiété.

Afin de compléter ce résultat, nous avons ensuite réalisé le test du rotarod. **Ce test permet de mettre en évidence des troubles de coordination motrice et d'apprentissage moteur** (voir p.45). Nous avons effectué un protocole à vitesse constante. Les animaux sont placés sur une barre cylindrique tournant à 14 rotations/minute. Les animaux sont entraînés pendant 5 jours. Le temps de maintien des souris sur la barre est calculé (Figure 38).

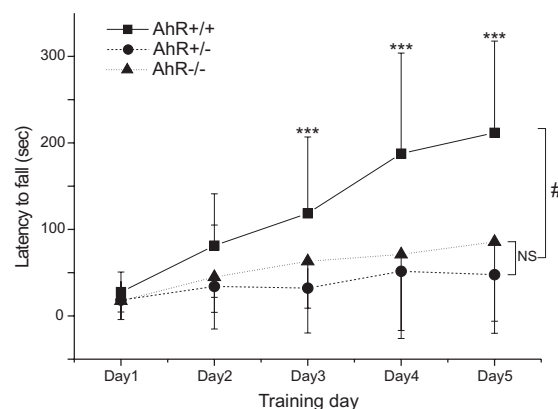
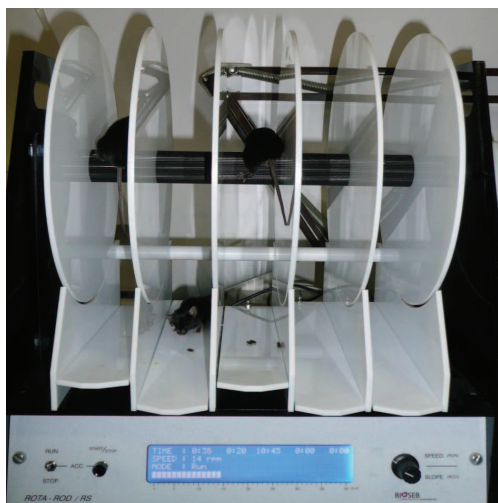


Figure 38 : Test du rotarod.

Le temps de maintien de chaque groupe de souris $AhR^{+/+}$, $AhR^{+/-}$ et $AhR^{-/-}$ est mesuré pendant 5 jours. ***, $p < 0,001$ correspond à la différence significative avec le premier jour d'apprentissage, #, $p < 0,001$, ANOVA à 2 facteurs entre les différents groupes, NS : résultats non significatifs.

Le temps de maintien des souris $AhR^{+/-}$ et $AhR^{-/-}$ est significativement diminué par rapport aux souris $AhR^{+/+}$. Ce résultat montre que les souris $AhR^{-/-}$ ont des troubles de l'apprentissage moteur et de la coordination motrice. Les défauts de maintien sur le rotarod peuvent être dus à plusieurs facteurs comme un défaut cérébelleux, une altération de la force musculaire ou de l'innervation des muscles. Ces questions sont actuellement étudiées par l'équipe du Pr. Massaad (CeSEM) avec qui nous collaborons.

Le traitement de souris AhR^{+/+} avec un ligand exogène très affiné du récepteur (TCDD) a été réalisé par la suite afin d'étudier la perturbation de la fonction endogène du AhR. Nous avons utilisé une dose élevée de dioxine pour cette étude (25 µg/kg de TCDD pendant 6 semaines avec 1 injection par semaine). Toutefois, nous n'avons pas observé l'apparition du nystagmus spontané chez ces souris après ce traitement sub-chronique. Toutefois, les résultats de marquage du récepteur ont montré son expression transitoire pendant le développement embryonnaire dans des structures potentiellement impliquées dans les réflexes de stabilisation du regard (ex: cellules ganglionnaires de la rétine). Il serait intéressant de voir les effets d'un traitement avec des doses aiguës et chroniques de TCDD de femelles sauvages gestantes sur l'apparition du nystagmus chez les souris de génération F1.

Article 2 : Endogenous disruption of the Aryl hydrocarbon Receptor functions in the mouse cerebellum

Auteurs: Aline Chevallier, Chris Ottolenghi, Frank Letourneur, Sébastien Jacques, Stéphane Pierre, Linh-Chi Bui, Robert Barouki, Xavier Coumoul

Article en préparation

V. Perturbation endogène des fonctions du AhR dans le cervelet de souris C57BL/6 par la dioxine.

Article en préparation.

A. Contexte scientifique

En parallèle des études comportementales réalisées chez la souris AhR^{-/-}, j'ai travaillé sur l'identification de nouveaux gènes cibles régulés par le AhR dans le système nerveux central. Par ailleurs, nous avons souhaité compléter ce travail par l'étude de la « perturbation de la fonction endogène » du AhR dans le cervelet par la TCDD²⁶.

La « perturbation de la fonction endogène » est une hypothèse basée sur plusieurs travaux publiés par des laboratoires indépendants résultant d'études menées sur les modèles animaux AhR KO. Initialement, le AhR a été décrit comme un récepteur de xénobiotiques et sa principale fonction décrite est son rôle dans la régulation du métabolisme de ces composés. Comme indiqué précédemment, chez les invertébrés, les orthologues du AhR ne lient pas la TCDD et régulent des fonctions endogènes (différenciation neuronale,...). L'acquisition de la « fonction de récepteur » au cours de l'évolution pourrait simplement être assimilée à un gain de fonction sans perte des propriétés régulatrices précitées, toutefois, plusieurs observations récentes indiquent qu'un détournement ou une perturbation de la fonction endogène pourrait aussi intervenir en cas de liaison à un polluant. Ainsi, de manière surprenante, les effets d'une invalidation de la fonction du AhR et ceux d'un de ses ligands les plus puissants, la TCDD sont souvent équivalents, à titre d'exemple, les souris AhR KO développent une fibrose hépatique portale que nous observons chez des souris traitées par la TCDD de manière sous-chronique (voir 3^{ème} article). Plus récemment, l'équipe du Dr A. Puga (qui avait déjà montré que des lignées hépatiques AhR KO et AhR^{+/+} traitées par la TCDD se comportaient de la même manière) a réalisé des expériences de puces à ADN couplées à du « ChIP on chip » (Chromatin ImmunoPrecipitation on chip) sur des cellules d'hépatocytes murines Hepa-1c1c7 (Sartor et al., 2009). La liaison du AhR aux promoteurs des gènes cibles a été caractérisée en présence et en l'absence de TCDD et de benzo(a)pyrène (BaP), un autre ligand du AhR. Ainsi, à l'état basal (sans TCDD ou BaP), 750 promoteurs sont liés par le AhR, renforçant l'hypothèse d'un rôle endogène de ce récepteur. De plus, la plupart des gènes identifiés

²⁶ La TCDD, ligand exogène le plus affiné pour le AhR, entraîne de nombreux effets toxiques dont certains observés au niveau du système nerveux central. En effet, plusieurs études ont démontré qu'un traitement par la TCDD provoque une perturbation des processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose des cellules granulaires du cervelet (voir paragraphe II-B-2-c).

possèdent des fonctions transcriptionnelles, incluant de nombreux gènes à « homeobox » et sont impliqués dans le développement embryonnaire de certains organes. La liaison du AhR sur ces promoteurs en absence de ligand exogène pourrait s'expliquer par la présence de ligand endogène ou par des régulations post-transcriptionnelles (ex : phosphorylation, chapitre I.B.5.d) (Pollenz, 2002). Lorsque les cellules sont traitées par la TCDD ou le BaP, une modification des groupes de promoteurs liés par le AhR est observée : i) certains promoteurs de gènes impliqués dans le développement ne sont plus liés par le AhR ii) de nouveaux groupes de gènes émergent, comme ceux du métabolisme des xénobiotiques.

Nous posons donc l'hypothèse d'une plasticité structurale du AhR dont la fonction transcriptionnelle serait modifiée par la nature de son ligand (dans ce cas, ligand exogène versus ligand endogène). Cette hypothèse est illustrée dans la figure 39 :

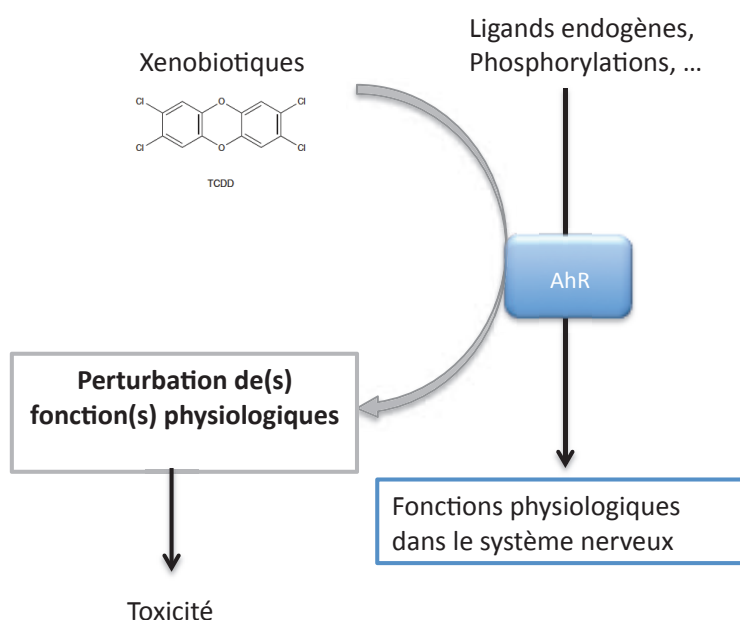


Figure 39 : Illustration de l'hypothèse de la perturbation endogène

Cette hypothèse fait intervenir le AhR et les ligands (xénobiotiques) de ce récepteur dont la liaison entraîne un détournement des fonctions de celui-ci et éventuellement une toxicité.

Elle est renforcée par des expériences réalisées au laboratoire qui montrent que le AhR ne lie pas le même élément de réponse (XRE) en fonction de la nature de son ligand exogène (dioxines vs. polyphénols) (chapitre I.B.5.c et chapitre VII).

B. Buts de l'étude

Nous avons réalisé une étude transcriptomique globale (puces à ADN) en utilisant des homogénats de cervelets issus de souris AhR^{+/+} et AhR^{-/-} traitées par 10 µg/kg de TCDD ou

contrôles, traitées par de l'huile de maïs (solvant utilisé pour diluer la TCDD) pendant 48h après injection intra-péritonéale. Le dessin expérimental est présenté dans la figure 40. L'analyse des gènes dans les quatre conditions a permis de mettre en évidence :

1. Les gènes régulés par le AhR physiologiquement dans le cervelet de souris par comparaison des listes de gènes régulés chez les souris $AhR^{-/-}$ contrôles et les souris $AhR^{+/+}$ (« Wild-Type ») contrôles. Ces résultats nous ont permis de définir de très nombreux gènes cibles endogènes du AhR dans le cervelet de souris.
2. Les gènes régulés par un traitement à la TCDD en comparant la liste de gènes régulés chez les souris $AhR^{+/+}$ traitées et les souris $AhR^{+/+}$ contrôles. Ces résultats nous ont permis d'identifier de nouvelles cibles géniques de la TCDD dans le cervelet de souris qui pourraient, par leur dérégulation, être à l'origine de certaines toxicités.
3. Les gènes régulés par un traitement à la TCDD en absence de AhR en comparant la liste de gènes régulés chez les souris $AhR^{-/-}$ traitées et les souris $AhR^{-/-}$ contrôles. Ces résultats nous ont permis de déterminer les effets de la TCDD passant par des voies indépendantes du AhR.
4. La correspondance entre les résultats obtenus avec les souris AhR KO et les souris traitées avec de la TCDD dans le cadre de l'hypothèse de la « perturbation endogène ».

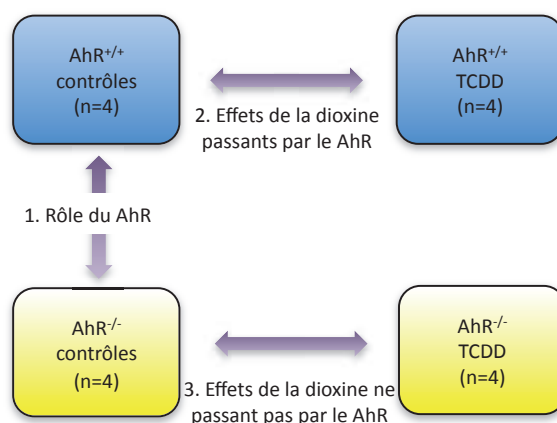


Figure 40 : Dessin expérimental de l'analyse transcriptomique.

Etude réalisée sur le cervelet des souris $AhR^{+/+}$ et $AhR^{-/-}$.

Dans une seconde partie de l'étude, nous avons comparé les gènes identifiés dans l'étude du cervelet avec d'autres travaux menés sur d'autres tissus comme le foie et le rein (Boutros *et al.*, 2009).

C. Résumé en français

La TCDD ou 2,3,7,8 TétrachloroDibenzo-p-Dioxine, contaminant environnemental, est un agent neurotoxique qui active le AhR. Plusieurs études montrent que la dioxine altère l'homéostasie du cervelet en perturbant la différenciation des précurseurs des cellules granulaires et en induisant l'apoptose. De manière intéressante, les orthologues du AhR identifiés chez les invertébrés, sont exclusivement exprimés dans les neurones et jouent des rôles importants dans le développement neuronal. Ainsi, ce récepteur pourrait également être important pour la mise en place du système nerveux central des mammifères. Cependant, ces fonctions n'ont pas été identifiées à ce jour. Nous avons caractérisé le profil global d'expression des gènes dans le cervelet de souris C57BL/6J AhR^{+/+} et AhR^{-/-} traitées ou non par de la dioxine (10 µg/kg) pendant 48h. L'expression de 2735 gènes est significativement régulée chez les souris AhR^{-/-} comparées aux souris AhR^{+/+}, incluant des gènes à « homéobox » et des régulateurs de la différenciation neuronale. De plus, 1010 gènes ont une expression altérée par la dioxine chez les souris AhR^{+/+}, dont les enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Seulement 155 gènes ont une expression modifiée chez les souris AhR^{-/-} traitées par la dioxine. L'utilisation de l'analyse « Focus » (Cole *et al.*, 2003), nous a permis d'identifier un grand nombre de gènes dont l'expression est régulée de la même manière par la dioxine, chez les souris AhR^{+/+}, et chez les souris AhR^{-/-} non traitées. Ces résultats montrent que le AhR régule de nombreux gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie du cervelet de souris et que le traitement par un ligand exogène comme la TCDD, perturbe ses fonctions de régulation endogène.

Title page

Title: Endogenous disruption of the Aryl hydrocarbon Receptor functions in the mouse cerebellum

Authors: Aline Chevallier^{1,2,#}, Chris Ottolenghi^{1,2,3,#}, Frank Letourneur⁴, Sébastien Jacques⁴, Stéphane Pierre^{1,2}, Linh-Chi Bui^{1,2}, Robert Barouki^{1,2,3}, Xavier Coumoul^{1,2,†}

¹ INSERM UMR-S 747, Toxicologie Pharmacologie et Signalisation Cellulaire, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris France

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité

³ AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Biochimie Métabolique, Paris, France

⁴ Plate-forme génomique de l'institut Cochin, bâtiment Gustave-Roussy, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France

: both authors contribute equally to this work

Grant support: this work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; all authors); the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (Bourse doctorale, Aline Chevallier); the région île de France (Bourse doctorale, Stéphane Pierre) ; the Fondation pour la recherche médicale (Bourse post-doctorale, Linh-Chi Bui), the Ligue contre la cancer (bourse post-doctorale, Linh-Chi Bui) and the Université Paris Descartes.

Abbreviations: Aryl hydrocarbon Receptor (AhR); TetraChloroDibenzo-p-Dioxin (TCDD)

†Address correspondence to:

Xavier Coumoul, INSERM UMR-S 747, 45 rue des Saints Pères 75006 Paris France; Phone: +33 1 42 86 33 59; Fax: +33 1 42 86 38 68; E-mail: xavier.coumoul@parisdescartes.fr

Chris Ottolenghi, INSERM UMR-S 747, 45 rue des Saints Pères 75006 Paris France; Phone: +33 1 42 86 33 59; Fax: +33 1 42 86 38 68; E-mail: chris.ottolenghi@parisdescartes.fr

Writing assistance: we thank Dr Lawrence Aggerbeck for his critical reading of this manuscript.

Author contributions: Aline Chevallier & Chris Ottolenghi were involved in the study concept and design and statistical analysis, in drafting of the manuscript, in the acquisition of data, analysis and interpretation of data, in critical revision of the manuscript for important intellectual content; Aline Chevallier, Sebastien Jacques et Franck Letourneur were involved in microarray experiments, and part of the analysis, Stéphane Pierre et Linh-chi Bui were involved in the collection of data; Robert Barouki and Xavier Coumoul were involved in study supervision.

Abstract

The environmental contaminant TCDD (2,3,7,8 TetraChloroDibenzo-p-Dioxin) is a neurotoxic agent, which acts through the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR). A previous work has shown that TCDD affects the homeostasis of the cerebellum by disrupting the differentiation of granular precursor cells and inducing apoptosis. Interestingly, orthologs of AhR in *C. elegans* are exclusively expressed in neurons and are involved in the development of the nervous system. We hypothesized that this receptor might also play an important role in the mammalian central nervous system (CNS). However, any CNS function in mammals remains putative. We characterized the global gene expression profile in the cerebellum of C57BL/6J wild-type and AhR^{-/-} adult mice treated or not with TCDD (10 μ g/kg) during 48h. The expression of 2735 genes was significantly affected by the absence of the AhR, including homeobox genes or regulators of neuronal differentiation. Furthermore, the expression of 1010 genes was significantly affected by TCDD in an AhR-dependent manner, including xenobiotic metabolizing enzymes. In the AhR^{-/-} mice, only 155 genes have their expression regulated by TCDD. Interestingly, we found that several genes show similar changes of expression levels after both TCDD treatment of wild-type animals and by ablation of the AhR. Our findings provide evidence that the AhR possesses important endogenous functions in the cerebellum of mice and that the treatment by TCDD, disrupts those processes.

Introduction

2,3,7,8 TetraChloroDibenzo-p-dioxin (TCDD) is a persistent organic pollutant that exerts its toxicity leading ultimately to cancer through a ligand activated transcription factor, the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR). The AhR belongs to the basic Helix-Loop-Helix/Per-ARNT-Sim (bHLH/PAS) family. After ligand binding, the AhR translocates into the nucleus and heterodimerizes with its nuclear partner, Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT). The complex binds to xenobiotic responsive elements (XRE) located in the promoter of target genes and induces their transcription (ex: xenobiotic metabolizing enzymes or XME such as Cyp1A1). TCDD is associated with neurotoxicity in humans and animals. Indeed, children exposed to a mixture of PCB (polychlorinated biphenyls) and TCDD display a delayed motor development and hypotonia, two pathological phenotypes linked to the cerebellum function [1]. Furthermore, the head circumference of the children was negatively correlated with the quantity of TCDD found in the maternal milk [2]. Neurobehavioral studies in rodents exposed to TCDD during development showed an impairment of the performance in rats on the rotarod, a device which measure the motor coordination and motor learning [3]. Several studies have demonstrated that TCDD disturbs the cerebellar development. For example, gestational exposure to TCDD alters differentiation of granule neuron precursor cells [4]. In parallel, a recent study showed that TCDD induces apoptosis in cerebellar granule cells and increases the production of reactive oxygen species (ROS) REF.

Interestingly, the use of knock out models has unraveled some endogenous functions of the AhR in both invertebrates and vertebrates [5,6,7,8]. Orthologs of AhR in invertebrates do not bind exogenous ligands as in mammals and are involved in neuronal development and homeostasis [9,10]. These ancestral functions might be conserved in mammalian species but few studies have been performed to test this hypothesis. For example, Collins *et al.*, have revealed that the cerebellum of adult AhR^{-/-} mice express lower levels of the GABAergic receptor $\alpha 6$, a marker of granule cell in cerebellum, and a decreased DNA content [4]. These results suggest a physiological role of this receptor in the central nervous system, especially in the cerebellum.

According to the expression of AhR in the adult cerebellum of the rat [11], we performed a large-scale transcriptomic study on the cerebellum of mice (both wild-type (WT) and AhR KO (KO), treated or not with TCDD) to identify pathways regulated by the AhR. Interestingly, our analysis of the data led us to

conclude that the AhR might be a modulator of TCDD action and that TCDD also disrupts the endogenous functions of the receptor, which raises important questions relevant to the toxicity of persistent organic pollutants.

Materials & Methods

Mice experiments

All procedures used were in strict compliance with the European Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental purposes. INSERM review board and the Direction Départementale des Services Vétérinaires approved this study; authorization number 75-962. AhR^{-/-} and Wild-Type (AhR^{+/+}) mice are a generous gift of Pr. PM Fernandez-Salguero [7]. Eight AhR^{+/+} mice and eight AhR^{-/-} mice were used in this study. Male mice (7 weeks) were injected i.p. with 200 μ l of TCDD (10 μ g per kg of body weight) or the vehicle (corn oil) (four mice/group) during 48h. TCDD was purchased from LCG Promochem (Molsheim, France). Then, mice were euthanized by CO₂ inhalation. After sacrifice, the brain was immediately harvested and the cerebellum was dissected, directly freezed in liquid nitrogen and conserved at -80°C until use.

RNA sampling from cerebellum (including tissue extraction, RNA purification, checking of RNA purity)

A half of cerebellum was placed in 1 mL of Trizol® reagent (Invitrogen) with 2 stainless steel beads (Qiagen, Courtaboeuf, France) and was homogenized with a TissueLyser system (Retsch MM300, Germany). Total RNA was prepared using the RNeasy Lipid Mini Kit from Qiagen, following the manufacturer's instructions. DNase I step (Qiagen) was added to the RNeasy elution column according to protocol described by the manufacturer. The quality of total RNA was monitored by Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent technologies, Massy France).

Microarrays experiments (including hybridization and analysis)

Microarrays were carried out with Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST arrays (a genome wide array with 28000 probe sets) according to the manufacturer's protocol. Briefly, total RNA (300 ng) was labeled and cRNA (antisens RNA) was synthetized using the Affymetrix WT cDNA Synthesis and Amplification Kit. After cleanup protocol, ssDNA (sense single stranded DNA) was synthetized, fragmented and labeled with biotin. Biotin-ssDNA was hybridized onto microarrays according to the manufacturer's instructions. After 16h at 45°C, microarrays were washed and stained using Affymetrix fluidics station 450 and scanned with an Affymetrix GeneArray scanner 3000 7G. Fluorescence data were imported

into two softwares for analysis: Affymetrix® Expression Console™ and R Bioconductor. Gene expression levels were calculated using the RMA algorithm in Expression Console and flags were computed using a custom algorithm within R [12]. To limit potentially biased measurement (background or saturating) all probes that normalized intensity measures, were outside of a confidence interval were flagged 0. The confidence interval was $2 * \text{standard deviation}$ from the mean intensities of each chip. Three probe lists have been used for each comparison according to flagged measurement in the relevant chips. The “PP” list is made of probes only flagged as “Present” for all chips involved in the comparison. The “P50” list has been created filtering probes flagged as “Present” for at least half of the chips. The “All” list is made of all probes without any filter.

Unsupervised analysis of normalized gene expression values involved principal component analysis (PCA) using the `svd` function in R. The analysis was performed both on the entire non-filtered dataset and on a subset of transcripts that were selected for greatest differential expression across the four experimental conditions tested. The parameter measuring the degree of non-directional differential expression was the “total variance” calculated with the Focus software ([13]; see below). Filtering by total variance was meant to reduce the influence of variation unrelated to the experiments and indeed improved classification while preserving the overall topography of the PCA plots (Figure 1 shows the results based on a representative Focus total variance threshold corresponding to the top 1299 genes). This represents a modified (class-unbiased) form of the “semi-supervised PCA” concept of Bair & Tibshirani by incorporating some information on the classes of interest [14,15] but it makes no assumptions on any expected direction of change or relative importance thereof [16].

As for the supervised analyses, we carried out linear contrasts’ analyses using the Focus software v.5.0 [13]. Focus starts combining the across-dataset standard deviations of log ratios and differences of either the mean or the minimum untransformed expression values per gene per condition. These parameters are weighted by normalized contrasts that describe either a pairwise directions of change or any selected multiclass profiles of interest. Next, Focus either combines the resulting scores with scores representing the dataset-normalized single gene variance of the means, or directly calculates a false discovery rate (FDR) on the minimum expression values by a machine learning algorithm (PRIM, see [13]). Therefore, Focus scores reduce the effect of single gene variance estimation, as the latter may be little reliable in the presence of few replicates. Focus was found to ensure a 2-fold increase in

sensitivity at usual levels of false discovery rate [13]. We also used the standard FDR calculation on log ratios at optimal cutoffs estimated by bootstrap simulation, as implemented in the Focus software. Hierarchical clustering analysis was performed with the Genepattern software (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/>) on the statistical scores derived from supervised Focus analyses rather than on expression levels. This was meant to reduce data variability and to emphasize the relations between the conditions of interest.

Data were subsequently submitted to the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery version 6.7 (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>, [17,18] to model networks among genes.

qRT-PCR experiments

The mRNA levels of selected genes were measured by RT-qPCR. After RNA extraction, total RNA concentration was assessed with a spectrophotometer (ND-1000 NanoDrop, Nanodrop products, Wilmington, DE, USA). Reverse transcription was carried out on 2 μ g of each sample using the cDNA High-Capacity Archive Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) in a final reaction of 20 μ l according to the manufacturer's instructions. Specific oligonucleotides were designed using the OLIGO Explorer software (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO); gene specific primers used for real time PCR were: TDO2: forward 5'-TTACCTGCGTTCAACTGTG-3' and reverse 5'-AAAAGCCGACTGAGAATCC-3' and GAPDH: forward 5'-GTGGACCTCATGGCCTACAT-3' and reverse: 5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'. RT-qPCR was performed using 20 ng of cDNA and 100 nM of each primer and absolute SYBR Green Rox Mix (Thermo Electron SAS, Courtaboeuf, France) in a final volume of 10 μ l. RT-qPCR measurements was carried out on an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). PCR cycles were proceeded as described previously [19]. mRNA values were normalized to the expression level of GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). They were performed on an independent set of samples (n=5) for stringent validation.

Results

Protocol design

According to Petersen et al, the AhR is expressed in the adult central nervous system, especially in the cerebellum [11]. To identify the endogenous target genes regulated by the AhR in the cerebellum, we compared the expression patterns in this organ from both wild-type (WT) and AhR knock-out (KO) mice by a large-scale transcriptomic study using Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST arrays (28100 probes). Moreover, to identify new target genes of the TCDD-AhR axis, we also compared untreated WT vs TCDD-treated WT mouse cerebellum. In addition, we analyzed the effects of TCDD in the AhR KO mice to identify potential alternative pathways activated by this pollutant.

Comparison of WT versus KO mouse cerebellum

We first investigated the transcriptional responses of the cerebellum to AhR invalidation by comparing AhR KO to the AhR WT cerebellum. The list of differentially expressed genes included 1734 and 1001 genes that were up- and down-regulated, respectively, with a fold difference > 1.2 and passed the bootstrap cutoff by standard FDR estimation.

The DAVID analysis showed that the up-regulated genes in the KO mice (1734) were enriched in mitochondrial and nuclear cellular localizations. The enriched functions were diverse, including acetylation, various processes related to RNA metabolism (mRNA, tRNA and ncRNA), DNA metabolism and repair, and catabolism as well as biosynthesis and localization of proteins. Structural categories included phosphoproteins, zinc fingers and helicases (data not shown).

The converse list of top gene ontology categories down-regulated in the KO mice (1001) included many well-known developmental genes, some with identified roles in neuron differentiation and, particularly, many classical homeobox genes. In addition, proto-cadherins as well as phospholipases were depleted in the KO (data not shown).

Comparison of untreated vs treated WT mouse cerebellum

In order to identify the target genes regulated by xenobiotic ligands of the AhR, we used TCDD, which is a highly stable persistent organic pollutant, the only known cellular effect of which is to bind the AhR and activate well-characterized genes of the xenobiotic metabolism pathway.

We identified 707 and 303 transcripts that were up or down-regulated by TCDD, respectively.

The DAVID analysis showed that the up-regulated genes belonged to nuclear and nucleolar cellular localization ontologies and were involved in functions such as chromatin remodeling or DNA repair. Protein transport, acetylation, regulation of kinase functions were also enriched. Structural categories included zinc-finger domains, phosphoproteins and, as expected, xenobiotic metabolizing enzymes. Of note, several of these gene ontology categories were also up-regulated in the KO cerebellum (data not shown).

Strikingly, the converse list of top gene ontology categories down-regulated by TCDD in the WT cerebellum was also similar to the corresponding one which was down-regulated in the KO versus WT rodents, including many well-known developmental genes as well as several classical homeobox genes. The Glycoprotein category was also top scoring, including many cadherins. Other significant categories mostly represented other features associated with these two groups of genes (data not shown).

Comparison of untreated vs TCDD-treated KO mouse cerebellum

The only known molecular effect of TCDD is to bind and activate the AhR. In parallel to the WT mice, we also treated KO mice with TCDD in order to compare both mRNA expression profiles in the cerebellum of non-treated and treated AhR KO mice and to identify AhR-independent TCDD-dependent pathways.

The list of genes differentially expressed between the control KO and the KO-TCDD animals was shorter than for the above comparisons, with 104 up- and 51 down-regulated genes at the bootstrap optimal FDR cutoff. This shorter list was consistent with the hypothesis that TCDD mainly activates the AhR pathway. However, the DAVID analysis of these genes showed that only several cytochromes P450 (along with related categories) were enriched in the KO-TCDD cerebellum (CYP2B23, CYP2D40, CYP26C1), whereas the phosphorylation category was the only one significantly down-regulated. We asked whether a longer list of differentially expressed genes would be more informative and generated a new list based on an increased Focus score cutoff without applying FDR control, as this was found useful in an unrelated microarray analysis [16]. This resulted into 372 genes up and 413 down in the KO-TCDD (focus score 7 cutoff). The up-regulated categories in the KO-TCDD

cerebellum included mitochondrial proteins, oxidoreductases, acetylation, ubiquitin-related process, protein biosynthesis and other ribosome related activities (data not shown). The categories significantly down in the KO-TCDD included only phosphoproteins and acetylation (data not shown). Because one ontology category (acetylation) was present both in up and down genes, and because the yield of significant hits was relatively poor, we inferred that the alterations induced by TCDD in the AhR KO mice were quite mild or heterogeneous or, else, they mostly reflected currently poorly recognized pathways.

Unsupervised PC analysis of all the samples (WT and KO cerebellum in presence or absence of TCDD)

We next performed an unsupervised PCA (Principal component analysis), on the most variable genes from the complete dataset in order to identify which factor(s) impact the most on the observed variations (Figure 1 and see Methods). The greatest amount of genome-wide transcriptional variation (41%) was clearly the result of the differences between WT vs KO animals and was unrelated to TCDD (the first principal component or PC1, x-axis). The second greatest amount of correlated variation (PC2) accounted for 15% of total variance. PC2 reflected the differences related to TCDD; interestingly, the direction of the differences was affected by the genotype (WT vs KO). Indeed, the distribution of TCDD-treated vs untreated samples was opposite along PC2 depending on whether they were from WT or KO mice. Thus, PC2 represents genes that respond to TCDD in opposite directions depending upon the AhR expression. This result, consistent with the notion that the AhR acts as a modulator of TCDD rather than as its direct effector, was not anticipated from the gene ontology analysis (see above).

Combined analysis of WT-TCDD and KO-TCDD mouse cerebellum

In order to test if PC2 described a genuine effect, we plotted the focus scores measuring differential expression that all the genes showed for the comparison WT vs WT-TCDD (x-axis) with the focus scores for the comparison KO vs KO-TCDD (y-axis) (Figure 2A). As expected, we observed a major trend of negative correlation when we compared the degree of gene up-regulation induced by TCDD in the WT versus those induced by TCDD in the KO cerebellum. This trend was confirmed by the

subsets of genes passing the bootstrap-estimated FDR cutoff (for both pairwise comparisons defining the x- and y-axis), which were enriched in the same quadrants of the plot as the majority of the unselected genes (colored dots of Figure 2A; see legend). Thus, in the cerebellum, most TCDD-responding genes are regulated in opposite directions, depending on whether the AhR is present or not.

Combined analysis of WT/KO vs WT/WT-TCDD mouse cerebellum

In order to investigate to which extent and how TCDD action was mediated by the AhR function in the cerebellum, we compared the transcriptional changes induced by TCDD in the WT cerebellum to those observed between KO and WT cerebellum. We observed that several GO categories were similarly regulated in the WT-TCDD cerebellum and in the untreated KO cerebellum.

Thus, we plotted the focus scores that all the genes showed for the comparison WT vs WT-TCDD (x-axis) with the focus scores for the comparison WT vs KO (y-axis) (Figure 2B). If TCDD had a major action of activating/exacerbating the normal AhR function (as it would be expected for a traditional ligand – receptor couple), we would expect a negative correlation between the effects of TCDD and those of the KO. In contrast, we found an striking positive correlation, with >30 fold more genes showing a similar change of expression level with TCDD in the WT animals and in the untreated KO ones, than those showing a discordant change (2949 vs 86, or 615 vs 18, among the differentially expressed genes at focus score thresholds of 4 or 6, respectively.). Again, this pattern was reproduced by the genes most strongly associated with either pairwise comparison by FDR (colored dots of Figure 2B, see legend). This suggests that, in terms of the number of genes involved, by far the greater effect of TCDD was to repress/reduce rather than activate the endogenous AhR function in cerebellum. This result was then consistent with the DAVID analysis on the original pairwise comparisons, whereby we found that several gene ontology categories were enriched or depleted both in the untreated KO and in the TCDD-treated WT-mice as compared to untreated WT animals (see above).

Overall, the results depicted in Figure 2 (panels A and B) suggest that more genes show a similar expression change (up or down) in the WT treated by TCDD and in the KO rodents as compared to untreated WT ones, as well as a change in the opposite direction in the KO treated by TCDD as

compared to the untreated KO (WT-TCDD>WT, KO>WT and KO>KO-TCDD, or the reverse inequalities). This correlation trend over the three pairwise comparisons is confirmed in the panels C and D (Figure 2) which map the genes that are most strongly up- or down-regulated (based on bootstrap estimated FDR) in one comparison (WT vs KO in C, and KO vs KO-TCDD in D) onto the plot representing the scores of those genes in the two other comparisons. Therefore, the most common trend of variation is a similar regulation with the WT-TCDD condition and the KO condition. Nevertheless, the degree to which individual genes showed this “common” profile was quite heterogeneous.

Genes responding similarly to AhR ablation and TCDD

When we analyzed the expression patterns of individual genes, distinct expression patterns were consistent with the inferred “similarity” between the TCDD-treated WT and the untreated KO mice. For instance, some genes were down-regulated by TCDD in the WT, down-regulated to a similar degree in the KO, and were back at the WT level in the TCDD-treated KO. These genes included well-known developmental neuronal genes such as *Lhx2* (LIM homeobox protein 2), *Lhx9* (LIM homeobox protein 9), the ephexin gene *Ngef* (neuronal guanine nucleotide exchange factor), *Nrgn* (neurogranin) and *Cyp26C1* (Table 1); the expression intensities of the 19 top-scoring genes for this profile by bootstrap FDR are presented in Table 2.

Further down the list, the *Tdo2*, an enzyme involved in the metabolism of kynurenin (see Discussion) responded to TCDD in the wild-type mice though with relatively high variance, thus not passing the FDR cutoff. By real-time PCR, *Tdo2* showed a strong up-regulation in both the TCDD-treated WT and the untreated KO mice as compared to untreated WT ones, thus consistent with the major genome-wide trend (Figure 3).

Other genes fitted this pattern more subtly. In particular, some of them showed a large difference between the KO and WT, whereas TCDD induced a much smaller change, yet in opposite directions depending on genotype.

Other genes, including *Reep6* (receptor accessory protein 6), *B4Galnt1* (β -1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1), and *Mid1* (Midline 1), showed the mirror pattern of changes (up-regulation in the KO and WT-TCDD treated mice) (Table 1).

Examples of the minority of genes that had expression patterns consistent with TCDD activating the AhR were *Cldn1* (Claudin1), *Fah* (fumarylacetoacetate hydrolase). However, Claudin1 had similar levels in the TCDD-treated KO and in untreated WT rodents, thus indicating that they responded to TCDD, though to a different degree, both in the presence of the AhR and in its absence (Table 1).

Comparison of three different tissues (liver, kidney, cerebellum)

We analyzed a published dataset from a microarray study on the effect of TCDD and AhR-KO in the mouse liver and kidney [20]. As we did for the cerebellum, we plotted the focus scores that all the genes of either organ showed for the comparison WT vs WT-TCDD (x-axis) with the focus scores for the comparison WT vs KO (y-axis; Supplemental Figure 1). For both liver and kidney (plotted separately), there was a slight trend toward a positive correlation, yet this was by far less conspicuous than in the cerebellum. Indeed, unlike the cerebellum genes, a large number of liver and kidney genes showed expression changes that were consistent with TCDD activating the AhR.

The data suggested that the shared feature of these tissues was an action of TCDD that was similar to the ablation of the endogenous AhR function. In order to test if such a shared condition was ancestral, we carried out a hierarchical clustering analysis (HCA) on the 123 genes that showed the most significant expression changes in the three tissues, either in the KO vs WT or in the WT vs WT-TCDD comparisons (figure 4). In other terms, the list contains genes that were either systematically up (or down) regulated in all three tissues, as either the effect of TCDD or of AhR invalidation (see Methods). This helped us to classify the 6 corresponding conditions (3 tissues x 2 conditions). We found that while, in cerebellum, WT-TCDD and untreated KO conditions clustered together, for the two other tissues, the conditions clustered by the TCDD treatment (WT-TCDD and KO-TCDD), with these TCDD-treated conditions closer to the set of untreated KO and WT-TCDD conditions in the cerebellum as compared to the other conditions in this organ. This suggests that the negative correlation between the TCDD effect and the AhR function is ancestral and that the cerebellum preserves such an ancestral condition, whereas kidney and liver have developed additional AhR functions, many of them unrelated to TCDD and/or cerebellum.

Discussion & Conclusion

The primary goal of our study was to identify new target genes of the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) with two main approaches: 1) the comparison of mRNA expression profiles in the cerebellum between WT and KO mice models to characterize new endogenous functions of the AhR in this organ. 2) the comparison of mRNA profiles between the non-treated and the TCDD-treated cerebellum in order to characterize new target genes of the receptor, activated by a xenobiotic.

The most striking difference between the conditions tested was due to the genotype (WT vs KO) as indicated by the raw comparison between their mRNA profiles, the GO categorization and by the unsupervised principal component analysis (i.e., the PC1 in the PCA). Surprisingly, the PC2 (genomic variation due to TCDD) is modulated by the genotype suggesting that the AhR may modulate the response to TCDD rather than merely acting as its downstream effector. Such a putative “modulator” function suggests that the TCDD-AhR axis could represent one among several AhR-dependent pathways that respond to endogenous or exogenous signals. Moreover, using a similar approach and also, as suggested by the GO categorization, we found that the TCDD treatment acts similarly to the AhR ablation, suggesting that TCDD may also act as a disruptor of the endogenous functions of the receptor. For example, protocadherins and homeobox proteins were similarly down-regulated by TCDD or by the ablation of the AhR in the cerebellum.

The disruption of the endogenous functions of the AhR was previously suggested by several experimental studies. For example, Sartor et al. used the Hepa1c1c7 hepatoma cell line to study the binding of the AhR on promoters of target genes under two conditions (no treatment versus treatment with TCDD or benzo(a)pyrene) [21]. Chip on chip experiments showed that the AhR binds to 750 promoters in the absence of an exogenous ligand. Interestingly, several identified target genes belong to the homeobox transcription factor family and were characterized as regulators of embryonic development. The TCDD treatment modified the binding pattern of the AhR, which switched, for example, to promoters of xenobiotic metabolizing enzymes. This is highly consistent with our inference that the endogenous functions of the AhR are disrupted by the exposure to xenobiotics (Figure 5).

This raises several important questions related to the consequence of the exposure to xenobiotics. Firstly, what are the consequences of this disruption in term of toxicity? The description of the AhR as

a xenobiotic receptor leads to the classical view that most toxicities rely on the subsequent regulation (mostly activation) of target genes but not on the dysregulation of endogenous transcriptional patterns. Secondly, what timing of exposure is needed to eventually lead to toxic consequences? Indeed, acute disruption of endogenous transcriptional patterns might not be associated to long-term toxicity but could correspond to a simple adaptative process, which allows transient detoxication without significantly affecting the endogenous processes.

Additional questions related to those endogenous regulations also emerged. Indeed, the number of genes regulated by the AhR in the absence of any xenobiotic is much larger than the number of genes regulated by the TCDD-AhR axis. This could mean that the main role of the AhR is the endogenous one but in fact, this could take multiple forms. Indeed, several studies have shown that, according to the nature of the ligand, the AhR does not regulate the same targets, due to binding to alternative XREs [22]. This transcriptional plasticity, which might be the result of a structural plasticity, may be important because recent studies have identified several endogenous ligands of the receptor, including FICZ or kynurein [23]. Thus, the endogenous disruption could be the result of a competition between xenobiotics and endogenous ligands but it is important to consider that each endogenous ligand might have a different effect. Moreover, the persistence of the ligands is another important parameter to consider beyond of their affinity. For example, FICZ has a higher affinity for the human AhR than TCDD but is very instable. Consequently, it would be interesting to test the « endogenous disruption » hypothesis with alternative ligands of the AhR including classically studied xenobiotics (such as benzo(a)pyrene or polychlorinated biphenyls) but also polyphenols or suspected endogenous ligands (such as FICZ or kynurein). Finally, several experimental studies have shown that the AhR could be regulated by alternative mechanisms including post-transcriptional regulations (such as phosphorylation), adding more complexity to the whole picture [24].

Beside those exciting aspects, intriguing points are also raised by our study. For example, several TCDD-responding targets are activated in the absence of the AhR. While historically controversial, alternative receptors might then be involved similarly to the ones identified into the nuclear receptor family [25]. Moreover, the anti-endogenous AhR effect of TCDD is stronger in the cerebellum than in other organs such as liver or kidney, which express higher levels of the AhR. This could be explained by the predominant ancestral functions of the AhR in the neuronal tissue as compared to other organs

and by the secondary acquisition of the “xenobiotic receptor” function in those organs which are considered as essential in the detoxication processes.

Aknowledgements

We thank Nicolas Cagnard from the Necker Bioinformatic Department for help with Ingenuity Analyses.

PCA on the 1299 most variable genes from the complete dataset

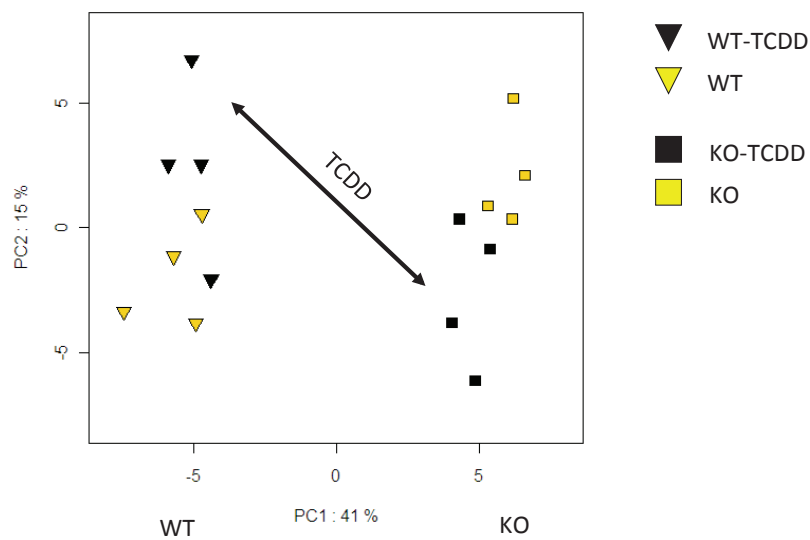


Figure 1: Unsupervised Principal Component Analysis (PCA) of the top variables genes (1299 genes) for all conditions.

Each symbol represents a condition, WT (yellow triangle); WTT (black triangle); KO (yellow square); KOT (black square). PC1: first principal component (X-axis) and PC2: second principal component (Y-axis). Genotype is responsible for the majority of variability in global gene expression (PC1: 41%), whereas treatment by TCDD is responsible for 15% of the variability (PC2: 15%)

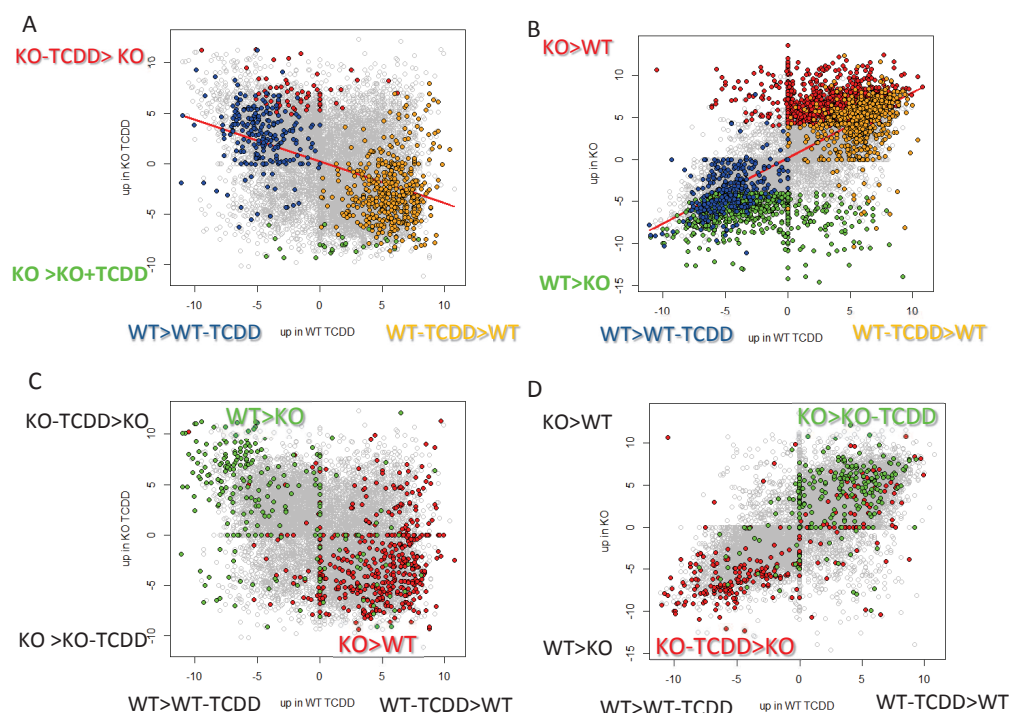


Figure 2: Supervised Focus analysis

Focus scores corresponding to the degree of differential expression shown by each gene in pairwise comparisons of relevant conditions were plotted in this graph. A, C: genes differentially expressed in WT vs WT-TCDD (X-axis) and KO vs KO-TCDD (y-axis) in mouse cerebellum, B, D: genes differentially expressed in WT vs WT-TCDD (X-axis) and KO vs WT (y-axis) in mouse cerebellum. In all plots, each grey dot represents all the genes from the gene expression dataset. In A and B, colored dots identify gene subsets of greater interest because they pass the bootstrap-estimated FDR cut-off : blue and yellow dots are the top list genes up- or down-regulated by TCDD in the WT (vs the WT, A and B), whereas red and green dots are the top list genes that are up- or down-regulated either by TCDD in the KO vs the KO (A) or by ablation of AhR vs WT (B). In C and D, colored dots represent the genes that are most strongly up-regulated (by bootstrap estimated FDR) in a distinct pairwise comparison. In C, red and green dots represent genes that are up- or down-regulated in the KO relative to WT. The panel also shows that the green genes map to areas of the plot corresponding to genes up- in the KO+TCDD relative to KO and up in the WT relative to WT+TCDD. The red genes show the reverse association. In D, red and green dots represent genes that are up- or down-regulated in the KO-TCDD relative to KO. The panel also shows that the green genes map to areas of the plot corresponding to genes up- in the KO relative to KO+TCDD and up in the WT+TCDD relative

to WT. Thus, C and D show that a significant proportion of genes show similar expression changes in the KO and WT-TCDD relative to WT and the opposite direction of change in the KO+TCDD relative to KO.

Gene symbol	Gene name	Fold induction		
		WTT/WT	KO/WT	KOT/KO
Lhx2	LIM homeobox protein 2	0.79	0.74	1.38
Lhx9	LIM homeobox protein 9	0.66	0.58	1.73
Ngef	neuronal guanine nucleotide exchange factor	0.78	0.68	1.37
Nrgn	neurogranin	0.56	0.52	2.10
Cyp26C1	cytochrome P450, family 26, subfamily c, polypeptide 1	0.79	0.75	1.31
Reep6	receptor accessory protein 6	1.15	1.27	0.83
B4Galnt1	beta-1.4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1	1.10	1.12	0.91
Mid1	midline 1	0.94	2.50	1.07
Cldn1	claudin 1	0.86	1.32	0.71
Fah	fumarylacetoacetate hydrolase	0.91	1.45	0.97

Table 1: mRNA target genes of the AhR with altered expression due to TCDD exposure (WTT/WT) in an AhR-dependant manner, (KOT/KO) in an AhR-independent manner and altered by the abolition of the AhR. The fold induction is represented in this table.

Gene symbol/Affymetrix probe	Gene name	Fold Induction		
		WTT/WT	KO/WT	KOT/KO
CYP26C1	cytochrome P450, family 26, subfamily c, polypeptide 1	0.79	0.75	1.31
4930401B11RIK	RIKEN cDNA 4930401B11 gene	0.75	0.70	1.35
GM9860	predicted gene 9860	0.80	0.62	1.50
OLFR479	olfactory receptor 479	0.88	0.75	1.53
TMEM114	claudin 26	0.88	0.76	1.30
ALX1	ALX homeobox 1	0.81	0.82	1.15
DKKL1	dickkopf-like 1	0.85	0.84	1.183
C130060K24RIK	RIKEN cDNA C130060K24 gene	0.81	0.84	1.22
FGD5	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 5	0.93	0.80	1.24
OLFR550	olfactory receptor 550	0.94	0.84	1.23
RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	1.14	1.03	0.87
NKAP	NFKB activating protein	1.06	1.23	0.76
10368654		1.28	1.25	0.90
SDA1	SDA1 domain containing 1	1.19	1.45	0.82
B4GALNT1	beta-1.4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1	1.10	1.12	0.91
MPHOSPH6	M phase phosphoprotein 6	1.29	1.27	0.94
RFC1	replication factor C (activator 1) 1	1.13	1.24	0.87
REEP6	receptor accessory protein 6	1.15	1.27	0.83
RNF160	listerin E3 ubiquitin protein ligase 1	1.22	1.28	0.87

Table 2: 19 top-scoring genes whose expression is up-regulated and down-regulated by the TCDD exposure in WT mice and in AhR KO mice. The fold induction is represented in this table.

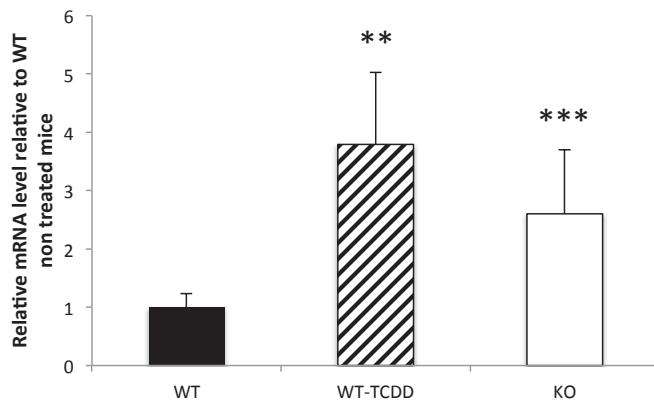


Figure 3: TDO2 mRNA expression in WT, WT-TCDD and KO mice. TDO2 mRNA levels were analyzed by quantitative real time PCR. **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$. Kruskal-Wallis statistical test was performed. Standard deviation (SD) is represented.

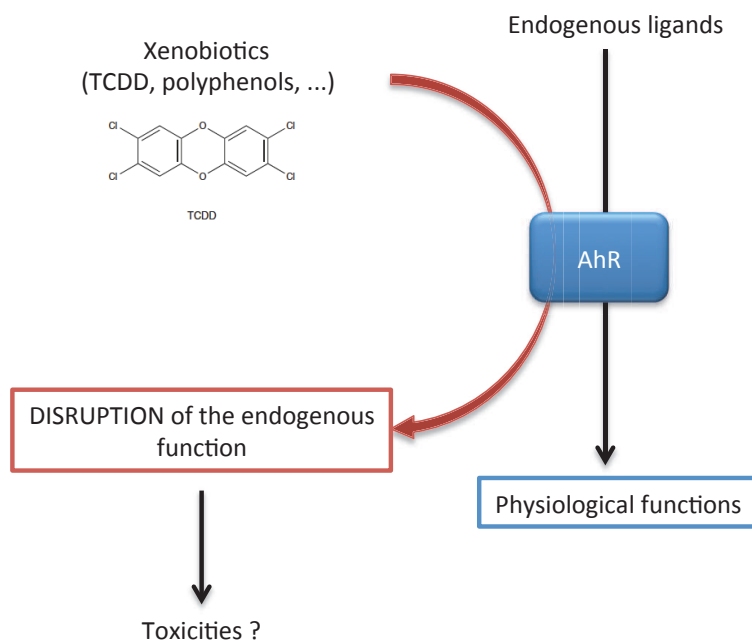
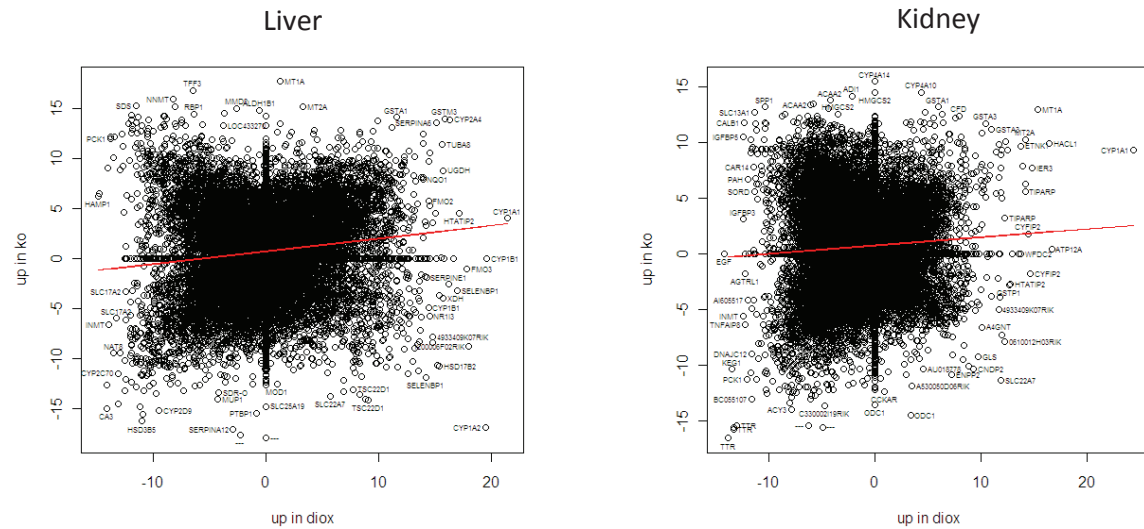


Figure 5: Schematic representation of the hypothesis of endogenous disruption of the AhR by its exogenous ligands. We hypothesize that AhR plays physiological functions in several tissues such as the cerebellum. The binding of an exogenous ligand, TCDD for example, disrupts physiological functions of the receptor and leads to transient activation of xenobiotic metabolizing enzymes.



Supplementary Figure 1. Focus scores corresponding to the degree of differential expression shown by each gene in pairwise comparisons of relevant conditions involving liver (A) or kidney (B) were plotted in this graph. As in Figure 2B, the x-axis represents the differential enrichment for WT+TCDD vs WT, and the y-axis represents the differential enrichment for KO vs WT. As roughly indicated by the regression line, there is a slight positive correlation between TCDD and KO. Nevertheless, the magnitude of the effect is clearly small, and all the quadrants of the plot are highly populated, with many genes thus showing a discordance between the direction of change with TCDD and in the KO.

Bibliography

1. Neuberger M, Rappe C, Bergek S, Cai H, Hansson M, et al. (1999) Persistent health effects of dioxin contamination in herbicide production. *Environ Res* 81: 206-214.
2. Nishijo M, Tawara K, Nakagawa H, Honda R, Kido T, et al. (2008) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 18: 246-251.
3. Thiel R, Koch E, Ulbrich B, Chahoud I (1994) Peri- and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: effects on physiological development, reflexes, locomotor activity and learning behaviour in Wistar rats. *Arch Toxicol* 69: 79-86.
4. Collins LL, Williamson MA, Thompson BD, Dever DP, Gasiewicz TA, et al. (2008) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure disrupts granule neuron precursor maturation in the developing mouse cerebellum. *Toxicol Sci* 103: 125-136.
5. Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6731-6736.
6. McMillan BJ, Bradfield CA (2007) The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Mol Pharmacol* 72: 487-498.
7. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, et al. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268: 722-726.
8. Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, et al. (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2: 645-654.
9. Huang X, Powell-Coffman JA, Jin Y (2004) The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*. *Development* 131: 819-828.
10. Kim MD, Jan LY, Jan YN (2006) The bHLH-PAS protein Spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of *Drosophila* dendritic arborization neurons. *Genes Dev* 20: 2806-2819.
11. Petersen SL, Curran MA, Marconi SA, Carpenter CD, Lubbers LS, et al. (2000) Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem. *J Comp Neurol* 427: 428-439.
12. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, et al. (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31: e15.
13. Cole SW, Galic Z, Zack JA (2003) Controlling false-negative errors in microarray differential expression analysis: a PRIM approach. *Bioinformatics* 19: 1808-1816.
14. Bair E, Tibshirani R (2004) Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data. *PLoS Biol* 2: E108.
15. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G (2002) Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6567-6572.
16. Garcia-Ortiz JE, Pelosi E, Omari S, Nedorezov T, Piao Y, et al. (2009) Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development. *BMC Dev Biol* 9: 36.
17. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44-57.
18. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37: 1-13.

19. Bui LC, Tomkiewicz C, Chevallier A, Pierre S, Bats AS, et al. (2009) Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity. *Oncogene* 28: 3642-3651.
20. Boutros PC, Bielefeld KA, Pohjanvirta R, Harper PA (2009) Dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries: comparison of liver and kidney in AHR-null mice. *Toxicol Sci* 112: 245-256.
21. Sartor MA, Schnekenburger M, Marlowe JL, Reichard JF, Wang Y, et al. (2009) Genomewide analysis of aryl hydrocarbon receptor binding targets reveals an extensive array of gene clusters that control morphogenetic and developmental programs. *Environ Health Perspect* 117: 1139-1146.
22. Guedard C, Barouki R, Morel Y (2004) Induction of the paraoxonase-1 gene expression by resveratrol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 2378-2383.
23. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, et al. (2011) An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478: 197-203.
24. Pollenz RS (2002) The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem Biol Interact* 141: 41-61.
25. Kelly MJ, Ronnekleiv OK (2012) Membrane-initiated actions of estradiol that regulate reproduction, energy balance and body temperature. *Front Neuroendocrinol*.

D. Conclusion

Ce travail a permis de :

- i) Identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles du AhR par la comparaison des expressions des gènes chez les souris AhR^{+/+} et AhR^{-/-} dans les conditions basales (souris traitées par de l'huile de maïs), dans le cervelet de souris. Celles dont l'expression est diminuée en absence du AhR, correspondent à des gènes à « homeobox » ainsi que des régulateurs de la différenciation neuronale. Ces résultats suggèrent que le AhR régule de nombreuses cibles géniques dans le cervelet à l'état basal. Toutefois, dans le premier article, la morphologie et l'une des fonctions du cervelet (évaluée par l'adaptation du VOR) ont été explorées et nous n'avons pas vu d'altération majeure de cette fonction cérébelleuse ni de changement morphologique visible par microscopie. D'autres fonctions du cervelet pourraient cependant être affectées par l'absence du AhR. De plus, ces modifications pourraient intervenir à différents stades du développement ; nous n'avons, pour l'instant, analysé que les cervelets d'animaux AhR^{-/-} âgés de 7 semaines.
- ii) Identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles de la dioxine dépendant du AhR dans le cervelet (1010 gènes). Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont, comme attendues, régulées par ce polluant. De nouveaux gènes comme la TDO2 (« tryptophan 2,3-dioxygenase ») sont régulés. La TDO2 est une enzyme clé du métabolisme de la cynurénine. Une augmentation de son expression, et par conséquent de la cynurénine, est associée à certains troubles mentaux comme la schizophrénie et les troubles bipolaires (Miller et al., 2008). De plus, la cynurénine a récemment été décrite comme ligand du AhR (Opitz *et al.*, 2011). De ce fait, il est possible qu'une activation du AhR soit entretenue par ce mécanisme.
- iii) Comparer des gènes dont l'expression varie de la même manière dans le cervelet des souris AhR^{-/-} et des souris AhR^{+/+} traitées à la dioxine, nous a permis de confirmer notre hypothèse, à savoir que la dioxine perturbe des « fonctions » endogènes du AhR. Nous avons ensuite comparé les gènes dont l'expression est régulée par la dioxine et/ou le AhR dans le cervelet avec ceux régulés dans d'autres organes comme le foie et le rein (Boutros et al., 2009). Une signature commune à plusieurs tissus a pu être dessinée. Nous avons également montré que,

dans ces tissus, la perturbation de la fonction endogène est moins prononcée. Cette observation soulève des questions sur le plan évolutif. Chez les mammifères, le AhR est ainsi exprimé de manière ubiquitaire et une de ses fonctions notoires est la régulation de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Une hypothèse pour expliquer le fait que la perturbation est moins prononcée dans le foie et le rein, pourrait être que la fonction de régulation des EMX dans ces organes est plus importante que dans le cervelet ce qui « masque » en partie la perturbation.

- iv) Enfin, nous avons identifié 155 gènes dont l'expression est régulée par la dioxine indépendamment de la présence du AhR. Les mécanismes impliqués n'ont pas encore été élucidés. Des récepteurs alternatifs (comme ceux identifiés récemment dans le cas des récepteurs stéroïdiens) pourraient expliquer ce phénomène mais cette hypothèse n'est pas évoquée dans la littérature. Il est à noter toutefois qu'un récepteur alternatif de ligands du AhR a été récemment identifié: le récepteur adrénergique pouvait lier le BaP (Mayati et al., 2012).

Revue 1: The AhRtwist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications

Auteurs: Aline Chevallier, Erwan Guyot, Robert Barouki, Xavier Coumoul

Revue acceptée dans Drug Discoveries and Therapeutics

VI. Les voies de signalisation du AhR : implications pharmacologiques et toxicologiques

Revue acceptée dans Drug Discoveries & Therapeutics

Durant ma thèse, j'ai participé à l'écriture d'une revue générale sur les différentes voies de signalisation du AhR et de leurs implications pharmacologiques et toxicologiques respectives. La première voie de signalisation décrite pour ce récepteur se met en place lorsqu'un ligand exogène (dioxine, polychlorobiphenyls, ...) se lie au récepteur. Le AhR subit alors une translocation nucléaire et se lie à des éléments de réponses classiques (XRE) situés dans les promoteurs de gènes cibles dont les enzymes du métabolisme des xénobiotiques. De nouveaux éléments de réponses ont été identifiés (Gouedard et al., 2004) et la liaison du AhR à ces XRE alternatifs entraîne la régulation de gènes impliqués dans les processus d'apoptose (BAX) ou anti-athérosclérotique (paraoxonase 1, PON1). Par ailleurs, les phénotypes des différents modèles de souris AhR^{-/-} démontre que le récepteur joue un rôle dans le développement de nombreux organes. La cascade de signalisation déclenchée par le AhR pourrait ainsi être modulée par le type de ligand (endogène ou exogène) ou par des modifications post-transcriptionnelles du récepteur.

Dans cette revue, je me suis consacrée aux parties concernant les fonctions physiologiques du récepteur et ses ligands endogènes.

Title: The AhRtwist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications

Authors: Aline Chevallier^{§1,2}, Erwan Guyot^{§1,2}, Robert Barouki^{1,2,3}, Xavier Coumoul^{1,2}

Addresses:

¹ INSERM UMR-S 747, Toxicologie Pharmacologie et Signalisation Cellulaire, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris France

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Centre universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris France

³ AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, service de biochimie métabolique, Paris, France

§: Both authors contributed equally to this work

Corresponding author: Coumoul X. (xavier.coumoul@parisdescartes.fr).

Keywords: AhR, endogenous functions, SAhRM, ligands.

Teaser: the emerging concept of AhR ligands as potential pharmacological tools and the plasticity of the transcriptional responses of this receptor (depending on its ligands) are presented in this review.

1 **Abstract**

2 The Aryl Hydrocarbon Receptor is a transcription factor which is activated by diverse
3 compounds and regulates the expression of xenobiotic metabolism genes. Recent studies have
4 unraveled unsuspected physiological roles and novel alternative ligand-specific pathways for this
5 receptor. In this review, we discuss these novel aspects and focus on the different responses elicited
6 by the diverse endogenous/exogenous AhR ligands. In addition to challenge the relevance of the
7 “agonist/antagonist” classification of ligands, we introduce the concept of AhR plasticity as a primordial
8 factor in the generation of these pathways. Finally, we evoke several promising perspectives for the
9 pharmacological modulation of these responses.

10

11

Endogenous functions and ligands of the AhR

The commonly accepted model of AhR activation has been described in several reviews (Figure 1 on the right) (1). This model may be summarized, briefly, as follows. In the cytosol, AhR is associated with chaperones. When a ligand binds to the receptor, the complex translocates into the nucleus and dissociates. In the nucleus, hetero-dimerization with its partner ARNT (AhR Nuclear Translocator) occurs. This heterodimer binds to specific responsive elements, called XREs (xenobiotic responsive elements), located in target gene promoters and it modulates the transcription of these genes. The prototypical, and most studied, target gene is cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), a xenobiotic metabolizing enzyme.

Recent observations suggest that the AhR has physiological functions. This hypothesis is supported by the marked degree of conservation among species and the constitutive expression during development and in adult tissues of the AhR, and, even more importantly, by the developmental aberrations observed in AhR KO animal models.

The AhR is expressed in invertebrates such as *Caenorhabditis elegans* (worm) and *Drosophila melanogaster* (fly) and in vertebrates. Interestingly, in contrast to the vertebrate AhRs, there is no evidence that the fly and nematode AhR orthologs can bind exogenous ligands such as TCDD (2,3,7,8-tetrachlorobenzo(p)dioxin) (2, 3). The reason for this lack of binding is probably due to divergence of the PAS-B domains (essential for ligand binding in mammalian AhRs). Studies of chimeras between murine and *Drosophila* AhRs have identified subdomains, which play critical roles in the binding of ligands (4). Although TCDD does not bind to the AhR of invertebrates, this does not exclude the binding of other ligands, including endogenous ones, by the AhR. Those ligands remain to be identified. Moreover, the AhR signaling pathway in these invertebrates is highly conserved (heterodimerization with ARNT orthologs and binding to XREs).

Studies using invertebrates and vertebrates in which the AhR has been knocked out have unraveled some functions of the AhR that are not related to xenobiotic metabolism. In the worm, AHR-1 is expressed in several neurons and blast cells during embryonic and larval development. Worms that lack AHR-1 display several neurological defects (ex: social feeding behavior), which affect neuronal differentiation, axon guidance and cell migration. These functions appear to be due to the indirect transcriptional control that AHR-1 exerts on a G-coupled neuropeptide receptor and on some

1 members of the soluble guanylate cyclase family (5). In the fly, SPINELESS is expressed in several
2 tissues during embryonic and pupal development but mainly it regulates the leg development, the
3 morphology of the peripheral nervous system and the differentiation of photoreceptors that are
4 required for color vision (6).

5 These observations demonstrate that AhR orthologs play a role in the development of
6 invertebrates. However, the mechanism by which AhR is activated in these organisms remains
7 elusive, particularly as to whether or how a ligand might be involved. There is little evidence, at
8 present, that demonstrates that the functions that the receptor exerts in invertebrates, such as
9 promoting neuronal development, are conserved in vertebrates. One might speculate that, during
10 evolution, mutations in the PAS domains led to the acquisition of new functions, (ex: xenobiotic
11 metabolism) and to a broader tissue distribution of the receptor.

12 In vertebrates, the AhR genes are divided into two distinct clade lineages, AhR1 and AhR2.
13 During vertebrate evolution, these two clades underwent tandem gene duplication events. For
14 example, in fish, several AhR isoforms are present (2-6 per species), whereas mammals express only
15 a single protein. In the zebrafish, three forms have been identified (7). The first form, AhR1a, does not
16 bind exogenous ligands. Its function is unknown. In contrast, the biological functions of AhR2 appear
17 to be similar to those of the mammalian AhR. Recently, a third form, AhR1b, was identified which can
18 also bind exogenous ligands (8). The three isoforms are expressed differently in tissues. A number of
19 questions remain unanswered. In particular, it is unclear whether AhR1a and AhR1b possess
20 physiological functions in the brain and in the other organs in which they are expressed and whether
21 some or all of these functions are conserved in mammals.

22 The characterization of AhR orthologs and paralogs provides insights into the ancestral
23 functions of the receptor and suggests that AhRs, in mammals, play roles in addition to that of
24 regulating the expression of xenobiotic-metabolizing enzymes. Indeed, three laboratories have
25 observed phenotypic abnormalities in mice lacking the AhR (9). These three mouse models share
26 many phenotypic similarities such as resistance to dioxin toxicity, infertility, liver and cardiovascular
27 abnormalities and a delay of growth. These models, however, also display significant differences (ex:
28 sensitivity to infection (10)).

All these recent studies suggest that the AhR can be active in the absence of exogenous ligands. The discovery of endogenous ligands is, thus, a crucial aspect for better understanding the biology of the AhR. Heart and lung extracts (11) have been shown to contain AhR activators and several molecules have been identified as putative ligands: arachidonic acid and leukotrienes, heme metabolites and UV photoproducts of tryptophan (12). Among the most significant studies, 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), a tryptophan derivative with a very high affinity for the AhR, has been identified as a ligand and activator of CYP1A1 transcription (13). FICZ action on cells is transient due to metabolism by CYP1. Another tryptophan metabolite, kynurenine, has been shown to bind to the AhR, and was recently implicated in the development of brain tumors (14). It is noteworthy that the AhR, as well as several of its ligands, has been associated with the promotion or the prevention of atherosclerosis (15, 16). The presence of AhR activating compounds, such as oxidized LDL, also has been demonstrated in sheared human and bovine sera (17).

In parallel to the identification of putative endogenous ligands, new AhR xenobiotic activators, substantially different from polycyclic aromatic hydrocarbons, have been identified and characterized (12, 18). They have been described as AhR antagonists because they usually antagonize CYP induction. However, recent studies have demonstrated that these molecules activate the AhR, differentially, through alternative transcriptional responses.

Alternative AhR transcriptional responses (Figure 1)

The XRE track

The first relevant study concerned the pro-apoptotic protein Bax, which is induced by DMBA (a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon) in mouse oocytes (19). This regulation largely explains oocyte death upon PAH treatment. The authors show that the AhR is central to this induction, but surprisingly TCDD had no effect. Analysis of the promoter led to the identification of a TCDD-unresponsive XRE, which was defined as an unusual responsive element (Table 1). We, also, identified an unusual AhR target, paraoxonase-1 (PON1), which is a high-density lipoprotein-associated enzyme, involved in the elimination of organophosphorous xenobiotics and toxic endogenous compounds. Several AhR ligands (polyphenolic compounds such as quercetin or resveratrol but also 3-methylcholanthrene) have been shown to induce PON1 in a human hepatoma cell line in an AhR-dependant manner (20). However, TCDD was a poor inducer. Interestingly, promoter analysis has led to the identification of a

critical sequence in the proximal part of the promoter, which is slightly different from the consensus XRE (Table 1). Finally, another alternative sequence similar to the one identified in the promoter of PON1 (named AhR-RE type III) (Table 1) was recently found in the tyrosine hydroxylase gene promoter (21).

The participation of alternative XREs in the AhR transcriptional response suggest that the binding of a particular ligand might adapt the structure of the AhR to permit binding to a particular XRE sequence. The model hypothesizes that the AhR mediated transcriptional response is modulated by selective ligands of the receptor, in accord with the SAhRM concept (Selective AhR modulators) initially described by Stephan Safe (22). The identification of selective modulators of other receptors has strengthened the SAhRM concept, which is now gathering additional support and more focus.

The SAhRM concept

In some experimental systems, TCDD has been identified as an anti-estrogenic compound possibly having anti-tumorigenic effects. Stephen Safe and his colleagues focused their SAhRM research toward the identification of an AhR ligand (6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran or methyl-substituted diindolylmethanes) having the same ability as TCDD to inhibit estradiol-induced mammary tumor growth but not having any toxic effects with associated anti-estrogenic and anti-tumorigenic activities (22). Since then, new discoveries that elucidate the interactions between the AhR and nuclear receptor signaling have been made. However, the impact of the knowledge of these mechanisms on the further development of SAhRMs is still unclear (23).

Crosstalk between AhR signalling and other transcription factors or pathways

Interaction with the Estrogen Receptor alpha pathway

A number of AhR ligands have been shown to display endocrine disrupting activities. One of the main interacting partners of the AhR is the estrogen receptor alpha (ERa). Under some experimental conditions, it has been shown that treatment with dioxin can decrease the incidence of mammary tumors in Sprague Dawley rats (24). The AhR has been reported to inhibit ERa activity through a variety of mechanisms. Indeed, dioxin induces the expression of target genes such as Cyp1A1 and Cyp1B1, which are involved in the catabolism of steroid hormones including estrogens

(25). The heterodimer AhR/ARNT can also bind inhibitory XREs (iXRE) located in promoters of ERα target genes (pS2, Cathepsin D, table 1) thus blocking their transcription (26). Moreover, it has been demonstrated that the AhR can be part of a ubiquitin ligase complex which targets and degrades sex steroid receptors (27). These studies suggest an anti-estrogenic role for the AhR and appear to designate TCDD as an antagonist of ERα activation. However, recent studies have shown that the effect of TCDD is more complex. Indeed, in the absence of 17β-estradiol, the AhR interacts with ERα and this complex induces transcription of ERα target genes (28). In conclusion, AhR has a dual role depending on the estrogen concentration.

Despite a large number of studies on this crosstalk, many questions remain unanswered. Indeed, it is tempting to hypothesize that diverse AhR ligands will act differently on the ERα pathway. Moreover, the binding of the AhR to iXREs has not been investigated, yet, in the presence of these new AhR ligands.

Interaction with the NFκB pathway

Clearly, the AhR is involved in inflammatory pathways. The interaction of the AhR with NFκB could be a critical feature of this effect. NFκB is a family of ubiquitously expressed transcription factors, which are composed by the association of two subunits among RelA (p65), RelB (p50), c-Rel and p52).

Recent studies, attempting to unravel the mechanisms underlying the crosstalk between the AhR and NFκB, have demonstrated a complex interplay between these transcription factors. First, the AhR physically interacts with different NFκB subunits. A complex associating RelA and the AhR (but not ARNT) induces the proto-oncogene c-myc through binding to an NFκB responsive element in human breast cancer lines (29). Conversely, it has been found that RelA represses AhR-controlled CYP1A1 expression (30). Moreover, two signaling pathways (the classical AhR pathway and a novel pathway, which depends upon the activation of protein kinase A) have been shown to induce the formation of a RelB/AhR heterodimer (no ARNT) in the human monocyte cell line U937 (31). The existence of this latter pathway is supported by previous studies, which indicate that cAMP and PKA can activate the AhR (32). The authors also have demonstrated the participation of a novel responsive element, RelB-AhRE (Table 1), localized in the promoter of the interleukin 8 gene (33, 34).

1 Immunosuppressive effects of TCDD also have been described. A number of studies have
2 shown that dioxin and the AhR can suppress NFkB activity in immune murine cell lines (35, 36). Ruby
3 and colleagues showed that this inhibition was due to the formation of a RelA-AhR dimer, without DNA
4 binding.

5 AhR ligands may be considered as potential modulators of NFkB. In this respect, resveratrol
6 and other stilbene derivatives also display anti-inflammatory properties (37). Although several
7 mechanisms likely play a role, it is conceivable that the AhR could be involved.

8 9 ***Signaling pathways controlling the AhR transcriptional responses (Figure 1)***

10 In addition to being ligand-mediated, the activity of the AhR is controlled also by
11 phosphorylation via various kinases such as the c-Src kinase, MAPkinases and protein kinases A or
12 C. Although several MAPK phosphorylation sites of the AhR have been identified, their actual effects
13 on ligand binding and signaling have not been studied yet. In contrast, several studies have focused
14 on the PKA and PKC. An increased intracellular cAMP concentration leads to the phosphorylation and
15 nuclear translocation of AhR in a mouse hepatoma cell line cells via a PKA-dependent pathway (32).
16 Interestingly, ARNT does not co-precipitate with AhR under these conditions. Nuclear translocation of
17 this phosphorylated form of AhR does not affect CYP1A1 transcription suggesting that it may activate
18 a still-unknown alternative response. Other studies have shown that PKC activity is required for ligand-
19 dependent AhR signaling (38). PKC-dependant phosphorylation of the AhR and/or ARNT seems to be
20 required but it is not sufficient for the transcriptional activity of this heterodimer. One can suspect that,
21 as for nuclear receptors, this phosphorylation also may impact co-activator recruitment.

22 Calcium also has been shown to regulate the AhR pathway. Increased intracellular calcium in
23 cells exposed to TCDD- or PAH has been reported but Ca^{2+} also modulates the AhR response since it
24 has been shown to be required for the complete induction of Cyp1A1 (39). Further investigations to
25 characterize the calcium-related signaling pathway involved in the up-regulation of AhR target genes
26 by dioxin have identified CaMKIa in MCF-7 cells as being involved in TCDD-induced AhR activation
27 (40).

28 The AhR can also modulate the activity of kinases: recent studies have shown that the AhR
29 forms a cytosolic complex with Src. Binding of TCDD to the AhR triggers the release of Src and,

1 potentially, affects the level of activation of this kinase which is critical for several pathways involving
2 cell proliferation and migration (41). This is probably the best-characterized, non-genomic action of the
3 AhR.

5 ***Fine-tuning of the AhR response***

6 An important issue regarding the response of the AhR is whether its activation is transient or
7 sustained. This may have an impact on the toxicity of the AhR pathway. Several fine-tuning
8 mechanisms may contribute to the prevention of uncontrolled, sustained activation of the AhR. Several
9 studies have shown that the amount of AhR protein is decreased, considerably, following activation by
10 TCDD (42). This decrease is due to a stimulated, selective degradation by the proteasome and
11 constitutes a simple feedback mechanism at the protein level. Another critical feedback mechanism
12 involving the AhR Repressor (AHRR) was discovered several years ago by the Fujii-Kuriyama group.
13 The AhRR is induced by the AhR; it can form a heterodimer with ARNT, bind XRE and act most likely
14 as a dominant negative protein (43). These mechanisms, however, have been challenged by several
15 groups, which have shown that the increased expression of ARNT or of a defective DNA-binding
16 domain in the AhRR had no effect on the repressive action of the AhRR (44), (43).

17 The distributions of the AhR and ARNT and their regulations, during development, are also
18 elements that are important for controlling their endogenous functions or their roles under stress. In
19 C57Bl/6N mice embryos, in the early stages of development, the AhR is expressed, predominantly, in
20 the neuroepithelium and in the heart. In these tissues, the level of AhR decreases at later stages.
21 However, in other tissues (ex: liver), it gradually increases during organogenesis (45, 46). These
22 findings suggest a role for the AhR in development and indicate a possible switch in AhR function and
23 control during development. ARNT also participates in additional signalling pathways such as that
24 stimulated by hypoxia, and it is essential for life since ARNT KO mice are not viable (47). Activation of
25 these pathways may significantly reduce AhR signalling in tissues, which express low levels of ARNT.

26 **AhR ligands as potential pharmacological tools (Figure 2)**

27 Recent studies in several areas have suggested clearly that the pharmacological modulation
28 of AhR activity will be important in the near future.

For example, SAhRM have been developed as new anti-tumorigenic agents, but have been shown to be relevant for fields other than cancer. Dioxins and the AhR have been linked to the control of inflammatory processes with interactions between the AhR and NFkB factors which seem to be key mechanisms (48-50). Gary Perdew's group have demonstrated that several AhR ligands repress genes involved in the acute inflammation response, through decrease in RELA and C/EBP/β recruitment to the gene promoter (51). In addition, they synthesize a new AhR ligand, (substituting a hydroxy group for a methoxy one to a selective estrogen receptor modulator named Way-169916) which does not exhibit ER binding (52) but still displays the anti-inflammatory effect. Perdew's group also has identified a unique set of characteristics for a compound, named GNF351, defined as a "pure antagonist" which displays a high affinity for the AhR and an anti-inflammatory potential (53)

In addition to its modulation of inflammation, the AhR also has been recently associated with the regulation of other immune pathways (54, 55). The Th17 cells are suspected to play a role in several autoimmune diseases. In contrast, regulatory T cells (Treg) are a specialized subpopulation of T cells that maintain tolerance to self-antigens. The AhR specifically regulates the balance between both populations of cells in mice (56, 57). Indeed, in a mouse model of autoimmune pathology (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis), treatment with TCDD reduces the pathological manifestations due to an increased ratio of Treg/Th17. In contrast, FICZ has the exact opposite effect to that of TCDD. The authors demonstrated the critical involvement of the AhR, which directs the differentiation of Th17 cells in the presence of this ligand (58, 59). These observations indicate that two different ligands of the AhR can trigger either positive or negative effects on health. Importantly, these studies demonstrate that the AhR displays key immunological functions and, indicate that immunomodulation is a field in which the use of AhR ligands should be considered from a therapeutic perspective.

Finally, in a library of 100,000 molecules, an AhR ligand, with antagonistic properties, has been identified as a potent inducer of the proliferation of hematopoietic stem cells (HSC) *ex vivo* (60). The latter discovery represents a major hope in the widespread use of HSC transplantation, even if safety studies remain to be carried out to confirm the potential of this molecule as a therapeutic option.

Concluding remarks: the AhR(t) of plasticity

Recent studies using multiple models have clearly suggested that the functions of the AhR are more diverse than previously thought. Interestingly, the effects of ligands on signaling pathways seem to be highly plastic with associated responses which cannot be classified using the simple agonist/antagonist pharmacological alternatives. The nature of the ligand and the way it binds to the receptor, seem to determine the nature of the targeted XRE and the related transcriptional responses. For example, resveratrol must be considered not only as an antagonist of TCDD (which it actually is for the induction of CYP1A1) but also as an inducer/agonist of PON1. Nevertheless, this increased complexity of the AhR system is not bad news and has led to the concept of SAhRM and to the development of novel AhR ligands with interesting pharmacological activities.

Many mechanisms mediating the effects of AhR ligands remain elusive. Few large-scale studies have been performed which could be useful to study the global transcriptional responses of the AhR bound to alternative ligands (61, 62). At the molecular level, there is still no structure for the AhR. The discovery by Denison and co-workers of an antagonist that inhibits selectively the effects of dioxin and other related HAHs but not those of PAHs, flavonoids and indirubin suggests that the promiscuous PAS-B domain could have either different binding sites or a highly plastic one (63). The consequences of the activation of AhR by alternative ligands extend beyond the binding to XREs alone. The recruitment of co-activators or co-repressors has not been investigated extensively with the exception of a study by Hestermann and Brown who showed that, 3,3'-diindolylmethane and β -naphthoflavone (β -NF) allowed the recruitment of p160 family co-activators (NCoA1-3) and p300 acetyltransferase. Interestingly, those recruitments (including the AhR) display a sinusoidal variation after β -NF treatment suggesting that this process is highly dynamic. However, only β -NF triggered the binding of RNA polymerase II (64). Finally, several studies have established that AhR ligands may also trigger AhR-independent processes (at the cell membrane). These effects need to be better characterized in order to determine clearly the responses regulated by the AhR. Several approaches can be proposed to solve these questions. For example, AhR KO models will be suitable tools to decipher the effects of alternative ligands such as resveratrol and large-scale, high-throughput studies will be very relevant in this experimental picture. Moreover, development of reporter genes sensitive to each pathway

1 modulated by the AhR as well as the elucidation of its three-dimensional structure will be
2 breakthroughs in the field.

3 The AhR has been, directly or indirectly, linked to pathophysiological processes including
4 atherosclerosis, inflammation, immunomodulation and cancer. Interestingly, even if many aspects of
5 the AhR are insufficiently developed in terms of drug development, many drugs approved by the FDA
6 are AhR ligands or at least activators of this pathway including omeprazole, leflunomide, flutamide,
7 nimodipine (65). Both toxicological and pharmacological consequences should be considered. This is,
8 therefore, a stimulating time for all AhR experts and discoveries concerning this receptor are certainly
9 forthcoming, which may well expand the interest in the AhR well beyond traditional toxicological
10 considerations.

11 **Acknowledgements**

12 We warmly thank Dr. Lawrence Aggerbeck for his critical reading of this manuscript.

References

1. Abel J, Haarmann-Stemmann T. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem* 2010;391:1235-1248.
2. Butler RA, Kelley ML, Powell WH, Hahn ME, Van Beneden RJ. An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. *Gene* 2001;278:223-234.
3. Cespedes MA, Galindo MI, Couso JP. Dioxin toxicity in vivo results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One* 2010;5:e15382.
4. Kudo K, Takeuchi T, Murakami Y, Ebina M, Kikuchi H. Characterization of the region of the aryl hydrocarbon receptor required for ligand dependency of transactivation using chimeric receptor between *Drosophila* and *Mus musculus*. *Biochim Biophys Acta* 2009;1789:477-486.
5. Qin H, Zhai Z, Powell-Coffman JA. The *Caenorhabditis elegans* AHR-1 transcription complex controls expression of soluble guanylate cyclase genes in the URX neurons and regulates aggregation behavior. *Dev Biol* 2006;298:606-615.
6. Wernet MF, Mazzoni EO, Celik A, Duncan DM, Duncan I, Desplan C. Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic for colour vision. *Nature* 2006;440:174-180.
7. Zhou H, Wu H, Liao C, Diao X, Zhen J, Chen L, Xue Q. Toxicology mechanism of the persistent organic pollutants (POPs) in fish through AhR pathway. *Toxicol Mech Methods* 2010;20:279-286.
8. Andreasen EA, Hahn ME, Heideman W, Peterson RE, Tanguay RL. The zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor type 1 is a novel vertebrate receptor. *Mol Pharmacol* 2002;62:234-249.
9. Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett* 2007;581:3608-3615.
10. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 1995;268:722-726.
11. Chiaro CR, Patel RD, Marcus CB, Perdew GH. Evidence for an aryl hydrocarbon receptor-mediated cytochrome p450 autoregulatory pathway. *Mol Pharmacol* 2007;72:1369-1379.

- 1 12. Nguyen LP, Bradfield CA. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon
2 receptor. *Chem Res Toxicol* 2008;21:102-116.
- 3 13. Wei YD, Helleberg H, Rannug U, Rannug A. Rapid and transient induction of CYP1A1 gene
4 expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem Biol*
5 *Interact* 1998;110:39-55.
- 6 14. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, et al. An
7 endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2011;478:197-
8 203.
- 9 15. Conway DE, Sakurai Y, Weiss D, Vega JD, Taylor WR, Jo H, Eskin SG, et al. Expression of
10 CYP1A1 and CYP1B1 in human endothelial cells: regulation by fluid shear stress. *Cardiovasc Res*
11 2009;81:669-677.
- 12 16. Savouret JF, Berdeaux A, Casper RF. The aryl hydrocarbon receptor and its xenobiotic
13 ligands: a fundamental trigger for cardiovascular diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2003;13:104-
14 113.
- 15 17. McMillan BJ, Bradfield CA. The aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density
16 lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1412-1417.
- 17 18. Ashida H, Nishiumi S, Fukuda I. An update on the dietary ligands of the AhR. *Expert Opin*
18 *Drug Metab Toxicol* 2008;4:1429-1447.
- 19 19. Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, Laine J, et al. Aromatic
20 hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by
21 biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet* 2001;28:355-360.
- 22 20. Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene
23 expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 2004;24:5209-5222.
- 24 21. Akahoshi E, Yoshimura S, Uruno S, Ishihara-Sugano M. Effect of dioxins on regulation of
25 tyrosine hydroxylase gene expression by aryl hydrocarbon receptor: a neurotoxicology study. *Environ*
26 *Health* 2009;8:24.
- 27 22. Safe S, McDougal A. Mechanism of action and development of selective aryl hydrocarbon
28 receptor modulators for treatment of hormone-dependent cancers (Review). *Int J Oncol* 2002;20:1123-
29 1128.

- 1 23. Swedenborg E, Pongratz I. AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology* 2010;268:132-
2 138.
- 3 24. Holcomb M, Safe S. Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumor
4 growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Lett* 1994;82:43-47.
- 5 25. Coumoul X, Diry M, Robillot C, Barouki R. Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and
6 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res*
7 2001;61:3942-3948.
- 8 26. Safe S, Wormke M, Samudio I. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen
9 receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000;5:295-306.
- 10 27. Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, et al. Dioxin receptor
11 is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 2007;446:562-566.
- 12 28. Abdelrahim M, Ariazi E, Kim K, Khan S, Barhoumi R, Burghardt R, Liu S, et al. 3-
13 Methylcholanthrene and other aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor
14 alpha. *Cancer Res* 2006;66:2459-2467.
- 15 29. Kim DW, Gazourian L, Quadri SA, Romieu-Mourez R, Sherr DH, Sonenshein GE. The RelA
16 NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc
17 promoter in mammary cells. *Oncogene* 2000;19:5498-5506.
- 18 30. Ke S, Rabson AB, Germino JF, Gallo MA, Tian Y. Mechanism of suppression of cytochrome
19 P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Biol Chem*
20 2001;276:39638-39644.
- 21 31. Vogel CF, Sciallo E, Li W, Wong P, Lazennec G, Matsumura F. RelB, a new partner of aryl
22 hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 2007;21:2941-2955.
- 23 32. Oesch-Bartlomowicz B, Huelster A, Wiss O, Antoniou-Lipfert P, Dietrich C, Arand M, Weiss C,
24 et al. Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc Natl*
25 *Acad Sci U S A* 2005;102:9218-9223.
- 26 33. Vogel CF, Sciallo E, Matsumura F. Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated
27 induction of chemokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:722-726.

- 1 34. Vogel CF, Li W, Wu D, Miller JK, Sweeney C, Lazennec G, Fujisawa Y, et al. Interaction of aryl
2 hydrocarbon receptor and NF-kappaB subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8
3 overexpression. *Arch Biochem Biophys* 2011;512:78-86.
- 4 35. Ruby CE, Leid M, Kerkvliet NI. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses tumor necrosis
5 factor-alpha and anti-CD40-induced activation of NF-kappaB/Rel in dendritic cells: p50 homodimer
6 activation is not affected. *Mol Pharmacol* 2002;62:722-728.
- 7 36. Sulentic CE, Kang JS, Na YJ, Kaminski NE. Interactions at a dioxin responsive element (DRE)
8 and an overlapping kappaB site within the hs4 domain of the 3'alpha immunoglobulin heavy chain
9 enhancer. *Toxicology* 2004;200:235-246.
- 10 37. Heynekamp JJ, Weber WM, Hunsaker LA, Gonzales AM, Orlando RA, Deck LM, Jagt DL.
11 Substituted trans-stilbenes, including analogues of the natural product resveratrol, inhibit the human
12 tumor necrosis factor alpha-induced activation of transcription factor nuclear factor kappaB. *J Med*
13 *Chem* 2006;49:7182-7189.
- 14 38. Long WP, Pray-Grant M, Tsai JC, Perdew GH. Protein kinase C activity is required for aryl
15 hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol Pharmacol* 1998;53:691-700.
- 16 39. N'Diaye M, Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Corre S, Gilot D, Lecureur V, Monteiro P, et al.
17 Aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the
18 environmental contaminant benzo[a]pyrene. *J Biol Chem* 2006;281:19906-19915.
- 19 40. Monteiro P, Gilot D, Le Ferrec E, Rauch C, Lagadic-Gossmann D, Fardel O. Dioxin-mediated
20 up-regulation of aryl hydrocarbon receptor target genes is dependent on the
21 calcium/calmodulin/CaMKIalpha pathway. *Mol Pharmacol* 2008;73:769-777.
- 22 41. Dong B, Cheng W, Li W, Zheng J, Wu D, Matsumura F, Vogel CF. FRET analysis of protein
23 tyrosine kinase c-Src activation mediated via aryl hydrocarbon receptor. *Biochim Biophys Acta*
24 2011;1810:427-431.
- 25 42. Pollenz RS. The aryl-hydrocarbon receptor, but not the aryl-hydrocarbon receptor nuclear
26 translocator protein, is rapidly depleted in hepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-
27 tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol Pharmacol* 1996;49:391-398.

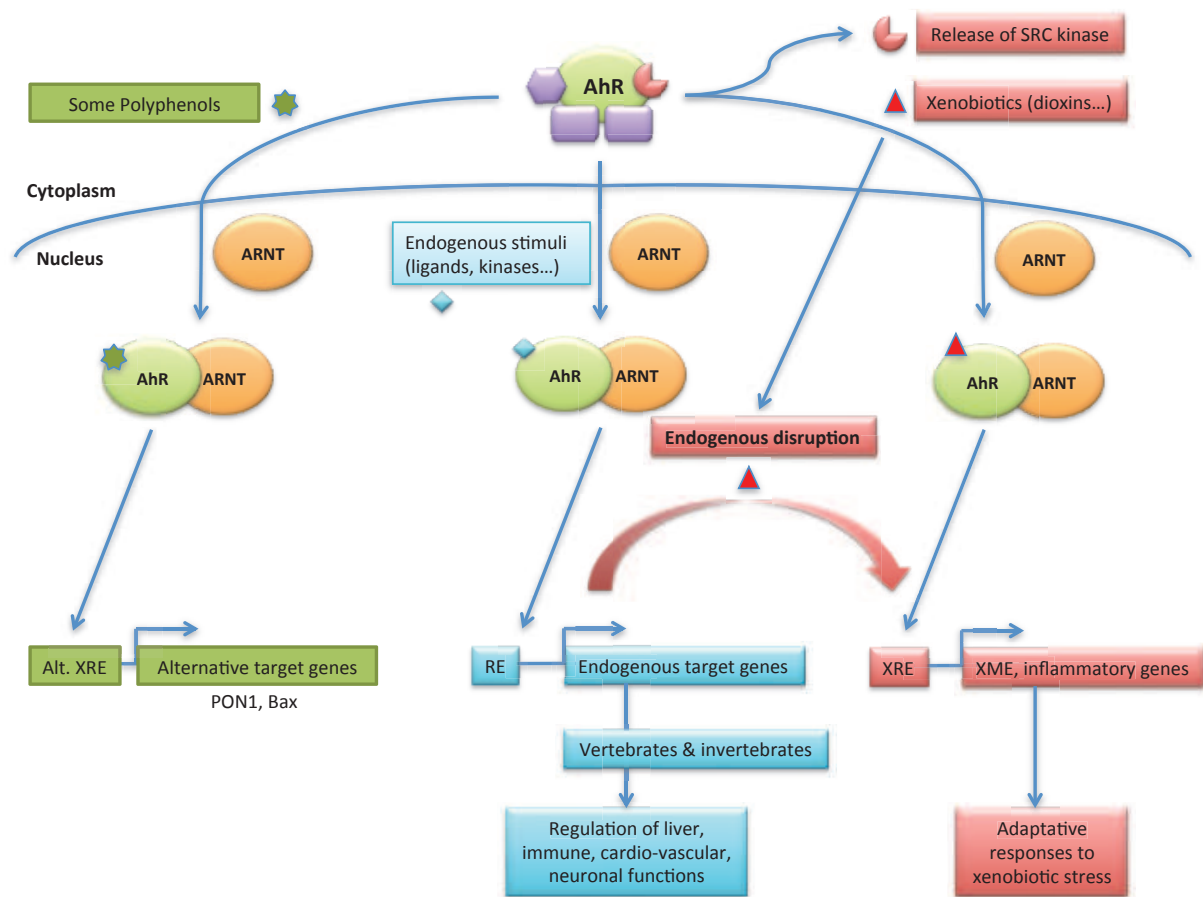
- 1 43. Evans BR, Karchner SI, Allan LL, Pollenz RS, Tanguay RL, Jenny MJ, Sherr DH, et al.
2 Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and
3 competition for AHR nuclear translocator. *Mol Pharmacol* 2008;73:387-398.
- 4 44. Hahn ME, Allan LL, Sherr DH. Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex
5 interactions involving the AHR repressor. *Biochem Pharmacol* 2009;77:485-497.
- 6 45. Abbott BD, Birnbaum LS, Perdew GH. Developmental expression of two members of a new
7 class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse
8 embryo. *Dev Dyn* 1995;204:133-143.
- 9 46. Abbott BD, Probst MR. Developmental expression of two members of a new class of
10 transcription factors: II. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in the C57BL/6N
11 mouse embryo. *Dev Dyn* 1995;204:144-155.
- 12 47. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and
13 responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 1997;386:403-
14 407.
- 15 48. Kim MJ, Pelloux V, Guyot E, Tordjman J, Bui LC, Chevallier A, Forest C, et al. Inflammatory
16 pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells. *Environ Health*
17 *Perspect* 2012;120:508-514.
- 18 49. Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, Sica G, Sileri P, Biancone L, MacDonald TT, et al. Aryl
19 hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the
20 gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2011;141:237-248, 248 e231.
- 21 50. Wu D, Nishimura N, Kuo V, Fiehn O, Shahbaz S, Van Winkle L, Matsumura F, et al. Activation
22 of aryl hydrocarbon receptor induces vascular inflammation and promotes atherosclerosis in
23 apolipoprotein E^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1260-1267.
- 24 51. Patel RD, Murray IA, Flaveny CA, Kusradi A, Perdew GH. Ah receptor represses acute-phase
25 response gene expression without binding to its cognate response element. *Lab Invest* 2009;89:695-
26 707.
- 27 52. Murray IA, Krishnegowda G, DiNatale BC, Flaveny C, Chiaro C, Lin JM, Sharma AK, et al.
28 Development of a selective modulator of aryl hydrocarbon (Ah) receptor activity that exhibits anti-
29 inflammatory properties. *Chem Res Toxicol* 2010;23:955-966.

- 1 53. Smith KJ, Murray IA, Tanos R, Tellew J, Boitano AE, Bisson WH, Kolluri SK, et al.
2 Identification of a high-affinity ligand that exhibits complete aryl hydrocarbon receptor antagonism. *J*
3 *Pharmacol Exp Ther* 2011;338:318-327.
- 4 54. Li Y, Innocentin S, Withers DR, Roberts NA, Gallagher AR, Grigorieva EF, Wilhelm C, et al.
5 Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell*
6 2011;147:629-640.
- 7 55. Kiss EA, Vonarbourg C, Kopfmann S, Hobeika E, Finke D, Esser C, Diefenbach A. Natural aryl
8 hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science*
9 2011;334:1561-1565.
- 10 56. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, et al. Control
11 of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2008;453:65-71.
- 12 57. Quintana FJ, Murugaiyan G, Farez MF, Mitsdoerffer M, Tukpah AM, Burns EJ, Weiner HL. An
13 endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress
14 experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:20768-20773.
- 15 58. Veldhoen M, Hirota K, Christensen J, O'Garra A, Stockinger B. Natural agonists for aryl
16 hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J Exp*
17 *Med* 2009;206:43-49.
- 18 59. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, Stockinger B. The
19 aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*
20 2008;453:106-109.
- 21 60. Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, Walker JR, et al. Aryl
22 hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science*
23 2010;329:1345-1348.
- 24 61. Yang SH, Kim JS, Oh TJ, Kim MS, Lee SW, Woo SK, Cho HS, et al. Genome-scale analysis
25 of resveratrol-induced gene expression profile in human ovarian cancer cells using a cDNA
26 microarray. *Int J Oncol* 2003;22:741-750.
- 27 62. Aluru N, Vijayan MM. Brain transcriptomics in response to beta-naphthoflavone treatment in
28 rainbow trout: the role of aryl hydrocarbon receptor signaling. *Aquat Toxicol* 2008;87:1-12.

- 1 63. Zhao B, Degroot DE, Hayashi A, He G, Denison MS. CH223191 is a ligand-selective
2 antagonist of the Ah (Dioxin) receptor. *Toxicol Sci* 2010;117:393-403.
- 3 64. Hestermann EV, Brown M. Agonist and chemopreventative ligands induce differential
4 transcriptional cofactor recruitment by aryl hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biol* 2003;23:7920-7925.
- 5 65. Hu W, Sorrentino C, Denison MS, Kolaja K, Fielden MR. Induction of cyp1a1 is a nonspecific
6 biomarker of aryl hydrocarbon receptor activation: results of large scale screening of pharmaceuticals
7 and toxicants in vivo and in vitro. *Mol Pharmacol* 2007;71:1475-1486.

8

1 Figure legends



2

3 **Figure 1: The Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) is activated by various ligands which leads to**

4 **alternative transcriptional responses.** The AhR is a cytoplasmic protein that is complexed to heat

5 shock proteins (HSP). Upon binding to a ligand, the AhR translocates into the nucleus and forms a

6 heterodimer with its partner, ARNT (AhR Nuclear Translocator). The release of the AhR from the

7 complex is also associated with the cytoplasmic activation of the Src kinase. The binding to aromatic

8 hydrocarbons (dioxins, polycyclic aromatic hydrocarbons) leads to adaptative responses including the

9 up-regulation of xenobiotic metabolism enzymes (XME) (on the right of the figure). Alternatively,

10 several polyphenols have been shown to activate the AhR but activate poorly the adaptative

11 responses associated with xenobiotic metabolism. Quercetin or resveratrol, two polyphenols activate

12 the AhR and the up-regulation of paraoxonase 1 (PON1) through binding to alternative XRE

13 (Xenobiotic Responsive Elements). Finally, the AhR displays an endogenous function which might be

14 regulated by endogenous ligands or other kinds of stimuli (phosphorylation...) and might involve the

15 binding of the receptor on responsive elements (RE). The use of AhR KO models has shown that this

16 function (which also depends on nuclear translocation, heterodimerization and DNA binding) is

1 associated to the regulation of liver, immune, cardio-vascular and neuronal functions. In this model,
2 the binding of exogenous ligands to the AhR might lead to disruption of the endogenous AhR
3 regulatory process.

4

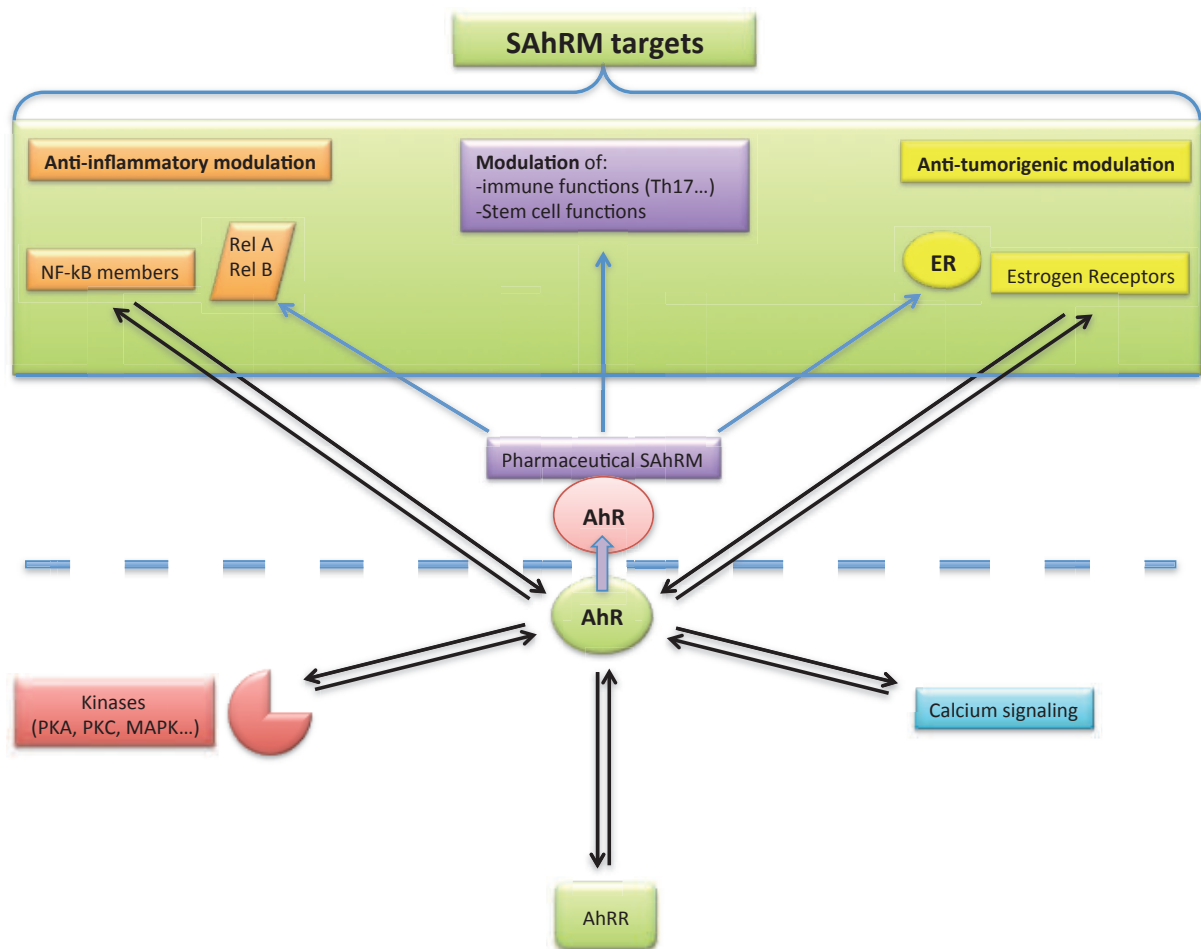


Figure 2: The AhR regulates multiple signaling pathways. The AhR regulates the activity of NF-kB members, estrogen receptors and recent studies demonstrate that it modulates immune and stem cell functions. According to the type of ligand that binds the AhR, selective AhR modulation can be obtained which might be of significant impact for the pharmaceutical field. Moreover, the AhR is connected to several kinases through multiple interactions (modulation of the AhR activity by phosphorylation...) and calcium signaling. The AhRR (AhR repressor) is an important AhR-responsive gene whose activity balances the activity of the AhR.

1

Target gene Responsive Element	Sequence	Model	AhR ligand
CYP 1A1 Canonical XRE	TnGCGTG A/G G/C A	Hepatic cell lines, hepatocytes and many models	Halogenated or polycyclic aromatic hydrocarbons
CYP 1A2 XRE II	CATG{N6}C [T/A]TG	Hepatic cell lines, hepatocytes	3-Methylcholanthrene (3MC), TCDD (dioxin)
Bax TCDD-unresponsive, BaP-responsive XRE	AcaagcctggGCGTGggc tatattg	Mice oocytes	Benzo(a)pyrene (BaP)
PON 1 TCDD-unresponsive, polyphenol-responsive XRE	TgccgacccgGCGGGgaggggcggg	HuH7 cell line	3MC, BaP Resveratrol, quercetin
Tyrosine Hydroxylase AhRE III	tgtcttcatgtcgtgtctaggcg	Neuro2a cell line	TCDD
Cathepsin D, c-fos, pS2 iXRE	CnG GCGTG A/G G/C C	MCF-7 cell line	TCDD
RelB-AhRE	AGATGAGGGTGCATAAGTTC	U937 cell line	TCDD & Forskolin

2

3 **Table 1: the various AhR-responsive elements, the corresponding genes in which they are**
4 **located, the model used to characterize them, and the type of ligand, which leads to**
5 **recruitment of the AhR**

Revue 2: Le récepteur de la dioxine : rôle endogène et médiateur de la toxicité de la dioxine

Auteurs: Aline Chevallier, Linh-Chi Bui, Xavier Coumoul


Revue publiée dans les cahiers de la nutrition et diététiques

VII. Le récepteur de la dioxine : rôle endogène et médiateur de la toxicité de la dioxine

Article publié dans les cahiers de nutrition et diététiques

J'ai rédigé également une seconde revue en français, concernant le récepteur AhR. Le rôle du AhR en tant que médiateur de la toxicité de la dioxine et ses nouvelles fonctions physiologiques, ont été traités dans cette publication.



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
www.em-consulte.com



TOXICOLOGIE

Le récepteur de la dioxine : rôle endogène et médiateur de la toxicité de la dioxine

The Ah receptor: Endogenous roles and dioxin-mediated toxicities

Aline Chevallier¹, Linh-Chi Bui¹, Xavier Coumoul^{1,*}

Inserm UMR-S 747, toxicologie, pharmacologie et signalisation cellulaire, université Paris Descartes, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

Reçu le 21 décembre 2010 ; accepté le 12 janvier 2011

Disponible sur Internet le 22 février 2011

MOTS CLÉS

AhR (récepteur Ah) ;
Polluants organiques
persistants ;
Dioxines ;
Contaminants
alimentaires ;
Toxicologie

KEYWORDS

AhR (Aryl
hydrocarbon
Receptor);
Persistent organic
pollutants;
Dioxins;
Food contaminants;
Toxicology

Résumé De nombreux polluants environnementaux sont des ligands du récepteur Ah ou AhR qui est un facteur transcriptionnel dont le rôle historiquement décrit était celui d'un régulateur de l'expression d'enzymes permettant justement l'élimination de ces polluants. Les dioxines et de nombreux autres hydrocarbures activent le récepteur et conduisent à une toxicité très variable des organismes exposés. Ces composés sont des contaminants de la chaîne alimentaire qui pour certains, s'accumulent dans les tissus adipeux. Un défi majeur de la toxicologie est de comprendre les mécanismes qui conduisent à ces toxicités. Des études récentes montrent que le AhR régule l'expression d'un grand nombre de gènes et que cette régulation peut aussi se faire en l'absence de ligands exogènes. Le but de cette revue d'articles est de présenter le récepteur et ses caractéristiques intrinsèques tout en abordant à la fois les problèmes de toxicité liés à une activation par des polluants mais aussi les nouvelles fonctions endogènes.
© 2011 Société française de nutrition. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary Many organic pollutants are ligands of the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), which is a transcriptional factor whose historical function was to regulate the expression of xenobiotic metabolizing enzymes involved in detoxication. Dioxins and aromatic hydrocarbons are ligands and activators of the AhR and lead to various toxicities on animal models. They contaminate the food chain and some of them can also accumulate in adipose tissues (namely the persistent organic pollutants). One critical challenge of toxicology is to define the mechanisms responsible for those toxicities. Recent studies also showed that the AhR regulate numerous genes sometimes without binding to a foreign compound. In this review, we will introduce the AhR and its ligands (exogenous and endogenous compounds) and present the toxicities related to the exposure to such molecules but also its endogenous functions.
© 2011 Société française de nutrition. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : xavier.coumoul@parisdescartes.fr (X. Coumoul).

¹ Contribution équivalente.

Introduction : polluants environnementaux et xénobiotiques

Les populations des pays industrialisés et celles de pays en voie de développement sont communément exposées à divers polluants environnementaux. Ces expositions peuvent être aiguës (ex. : marée noire d'hydrocarbures, empoisonnements) ou chroniques (ex. : contamination des sols et produits de l'agriculture par utilisation à faible dose mais régulière de pesticides). Ces contaminations posent la question de leur influence sur les écosystèmes et leurs populations notamment en termes de santé publique. Une autre problématique majeure engendrée par ces pollutions est la persistance de certains de ces contaminants dans l'environnement. En effet, si un nombre important de ces molécules peut être métabolisé par des enzymes de détoxification (appelées « enzymes du métabolisme des xénobiotiques² », ou EMX) produites par divers organismes, un certain nombre d'entre elles présente à la fois une résistance à la biotransformation et une hydrophobicité qui conduisent toutes deux, à leur stockage progressif dans les tissus adipeux, avec des demi-vies associées de plusieurs années [1–3]. Ainsi, une exposition à ces « polluants organiques persistants », ou POPs, peut conduire à une exposition chronique, le tissu adipeux jouant à la fois un rôle protecteur (« éponge » captant ces molécules, « épargnant » les autres tissus) et de libération continue. De nombreux pays ont signé un accord international plus connu sous le terme « convention de Stockholm » pour formaliser une liste (régulièrement mise à jour) de produits considérés comme des POPs et dont l'usage doit être interdit (<http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/tabid/673/language/en-US/Default.aspx>). Comme dit précédemment, les xénobiotiques non-POPs peuvent être modifiés chimiquement par une batterie d'enzymes appelée EMX. Le niveau d'expression de ces protéines est finement régulé au niveau transcriptionnel par des récepteurs aux xénobiotiques dont le AhR dont nous allons parler dans cet exposé.

Existence de récepteurs aux xénobiotiques et découverte du récepteur Ah (AhR pour Aryl hydrocarbon Receptor)

Bien que des centaines de milliers de xénobiotiques puissent être dénombrées, la première étape conduisant à leur métabolisme au sein des organismes exposés dépend de seulement quelques récepteurs intracellulaires (appelés récepteurs de xénobiotiques) : *pregnane X receptor* (PXR, reconnaissant plus de 60% des médicaments), *constitutive androstane receptor* (CAR) et *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) sont considérés comme les trois grands récepteurs de xénobiotiques compte tenu de l'absence de ligands endogènes clairement identifiés pour ces protéines (de nombreuses molécules endogènes lient le AhR, mais leur importance d'un point de vue physiologique est discutée à la fois en raison de problèmes liés à leur constante de dissociation et à leur synthèse locale) [4]. À cette liste, peuvent être rajoutées d'autres protéines comme par exemple les récepteurs *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR alpha) et *estrogen receptors* (ERs) décrits

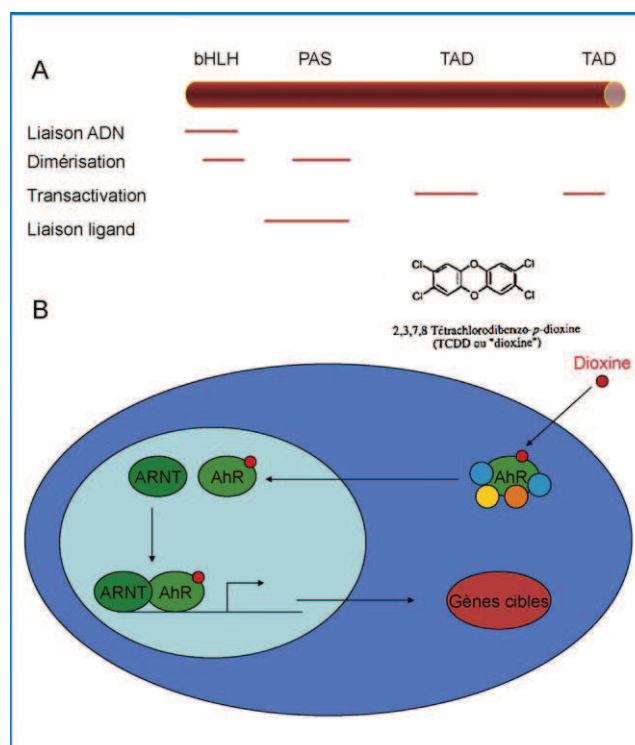


Figure 1. A. Le AhR appartient à la famille des protéines PAS (Per-ARNT-Sim). C'est un facteur transcriptionnel composé d'un domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation (bHLH : basic Helix Loop Helix), d'un domaine de liaison des ligands (PAS) et d'un domaine de transactivation (localisé dans la partie C-terminale de la protéine). B. Voie de signalisation du AhR.

historiquement comme possédant un ligand endogène (ex. : les estrogènes pour les ERs) mais identifiés depuis quelques temps comme récepteurs de xénobiotiques (phtalates pour le PPAR alpha ou certaines pesticides pour les ERs) [5–8]. Il est donc délicat de définir strictement une catégorie de récepteurs aux xénobiotiques mais tous possèdent une caractéristique commune : ils agissent comme des facteurs de transcription.

À ce titre, le récepteur Ah ou AhR a été découvert dans les années 1990. L'existence d'un locus Ah a été décrite à la fin des années 1970 et au début des années 1980 notamment par l'équipe de D.W. Nebert qui évoquait alors l'existence d'un ensemble de gènes contrôlant l'induction d'enzymes à activité « aryl hydroxylase » [9]. L'identification des acteurs de la voie de signalisation se fera au début des années 1990 avec le clonage à la fois du AhR et de son partenaire AhR *nuclear translocator* (ARNT) [10,11]. Tous deux appartiennent à la famille des protéines PAS (Per-ARNT-Sim) dont un grand nombre d'acteurs est impliqué dans le contrôle du rythme circadien chez la drosophile [12–15]. Le AhR a depuis été identifié à la fois chez les invertébrés (où son expression est neuronale [16–19]) et chez les vertébrés (où son expression est ubiquitaire) [20,21]. La fonction de récepteurs aux xénobiotiques a été acquise au cours de l'évolution car les récepteurs des invertébrés étudiés jusqu'à présent (AhR-1 chez les nématodes, Spineless chez la drosophile) ne lient pas de xénobiotiques [22]. Contrairement aux récepteurs PXR et CAR qui appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires [23–25], le AhR est un membre de la famille basic Helix Loop Helix (bHLH)/PAS [10,26,27] ; sa structure par domaines est présentée sur la Fig. 1A.

Le AhR est présenté généralement comme formant un complexe cytoplasmique avec des chaperonnes et des co-

² Xénobiotiques : petites molécules étrangères à l'organisme susceptibles d'exercer une toxicité sur les organismes exposés).

chaperonnes (Heat Shock Proteines 70 et 90 ; XAP2 ou X associated Protein ; p23 [28–31]. Quand un organisme est exposé à un ligand du AhR (composants de la fumée de cigarette, dioxines présentes dans notre alimentation, voir paragraphe ci-dessous), la liaison de ce dernier au récepteur provoque à la fois sa translocation dans le noyau et la dissociation du complexe [29]. Le AhR lie alors son partenaire ARNT et l'hétérodimère se lie à des éléments de réponse appelés *xenobiotic responsive element* (XRE) localisés dans des promoteurs de gènes cibles (Fig. 1B) [20,32]. Très logiquement, les équipes travaillant sur ce récepteur identifièrent dans un premier temps de nombreuses EMX comme gènes cibles (assurant le métabolisme du ligand du AhR selon un rétrocontrôle [33]) et définirent un grand nombre de ligands (la plupart, xénobiotiques) du AhR.

Les xénobiotiques de toute nature se lient à un petit nombre de récepteurs des dioxines—dont AhR ou récepteur des dioxines—qui activent l'expression des enzymes de leur métabolisme.

Le récepteur des dioxines est activé par de nombreux ligands, polluants environnementaux présents dans notre alimentation

Le AhR est communément appelé récepteur aux « dioxines ». Ce terme fait faussement référence à de nombreux polluants organiques persistants dont les PolyChlorinated Dibenzo-p-dioxins (PCDDs, 75 au total), les PolyChlorinated Dibenzo-p-furanes (PCDFs, 135 congénères) et les PolyChlorinated Biphenyls (PCBs). Des facteurs d'équivalence toxique (TEF, ou *toxic equivalent factor*) leur ont été assignés pour comparer leur toxicité [34,35]. Certains composés polybromés (PBDEs, ou PolyBromoDiphenylEthers) peuvent aussi exercer des activités proches de celles des dioxines [35]. La toxicité de ces composés (qui, pour la plupart, lient le AhR) est très variable en fonction des espèces considérées en raison d'une grande variabilité de leur constance de dissociation vis-à-vis du AhR (Kd) [36].

Contrairement aux PCBs qui furent très utilisés dans l'industrie en raison de leur grande stabilité (résistance à la pression, stabilité chimique, composés non inflammables et non conducteurs), les PCDDs et PCDFs sont presque toujours synthétisés involontairement notamment au cours de combustions incomplètes (incinérateurs municipaux) ou de processus industriels utilisant du chlore (blanchiment du papier, fabrication de PCBs ou de pesticides, recyclage de matériel électronique). En raison de cette grande stabilité physicochimique, les PCDDs et PCDFs sont des POPs dont la bioaccumulation peut s'étendre sur plusieurs décennies. Peu de microorganismes sont capables de les métaboliser efficacement [37]. Au niveau du compartiment biotique, la position des organismes dans la chaîne alimentaire influence le niveau de contamination (qui est plus élevé en haut de chaîne) mais n'est pas le seul élément ; ainsi, le régime alimentaire joue un rôle fondamental (ex. : oiseaux ne consommant que des poissons eux-mêmes contaminés). Le risque de contamination chez l'Homme est ainsi moins important que chez d'autres espèces bien qu'en position élevée dans la chaîne alimentaire.

Au niveau des écosystèmes et des aliments, les niveaux de POPs sont très variables en fonction des régions et des activités de ces dernières (industrielles, agricoles,...). L'histoire de certains pays est également directement liée à ces niveaux (ex. : guerre du Vietnam et utilisation de l'agent Orange comme défoliant contenant de très grandes quantités de dioxines) [38]. Des accidents industriels ont aussi été à l'origine de contaminations importantes des populations environnantes (ex. : dioxine et Seveso en Italie) [39]. Des contaminations volontaires ont également été observées (ex. : le président ukrainien V. Yushchenko en 2004 pendant la campagne présidentielle). Toutefois, l'essentiel des contaminations se fait via l'alimentation et notamment les produits laitiers, la viande et le poisson (en moyenne, 1–2 pg/kg par jour de PCDDs ou PCBs à activité dioxine dans la plupart des pays) [40–42]. Compte tenu de leurs importantes demi-vies et de leur accumulation dans les tissus adipeux, la quantité totale de dioxines peut augmenter de cinq à dix fois chez un individu entre 20 et 60 ans et ce bien que les quantités rejetées dans l'environnement tendent à diminuer depuis les années 1970 en raison de contrôles de plus en plus stricts [43,44]. Cette tendance peut notamment être observée par mesures des concentrations dans le lait maternel [45–49].

L'alimentation n'est pas qu'une source de « ligands AhR contaminants ». Des études récentes ont permis de montrer qu'un certain nombre de composés naturels de notre alimentation (fruits, thé, vin, légumes) sont aussi des ligands du récepteur ; c'est le cas de certains flavonoïdes (flavones, flavonols, flavanones, catéchines, isoflavones, anthocyanines, chalcones), indigoïdes, caroténoïdes, rétinoloïdes, polyphénols (curcumine, resvératrol) [50]. De nombreuses études ont montré que ces derniers pouvaient jouer à la fois le rôle d'agonistes ou d'antagonistes du récepteur Ah. Toutefois, les concentrations sanguines mesurées de ces composés laissent plutôt supposer une action antagoniste (vis-à-vis des contaminants type PCDDs ou PCBs) [50]. Un autre facteur important à prendre en compte est leur métabolisme important (impliquant notamment des EMX) conduisant pour certains à leur inactivation. L'hydrophobicité, la pharmacocinétique de ces composés dans l'organisme sont donc des facteurs importants à prendre en compte pour mesurer leur efficacité en tant que ligands du AhR (et compétiteurs vis-à-vis des polluants environnementaux) et étudier leur éventuel bénéfice pour les organismes consommateurs notamment en tant qu'antagonistes des PCDDs, PCDFs ou PCBs.

Une série de composés alimentaires « naturels » sont ainsi des ligands de AhR et leur présence est plutôt protectrice.

Rôles du AhR : protection versus toxicité de ses ligands

Historiquement, le AhR et son partenaire ARNT ont été caractérisés comme des régulateurs transcriptionnels de plusieurs enzymes et transporteurs du métabolisme des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) et/ou halogénés (HAH) et des polychlorobiphényles (PCB). Compte tenu de la toxicité et de la réactivité de certains de ces composés (réactivité chimique vis-à-vis de macromolécules)

cules comme les protéines ou l'ADN avec pour conséquence l'apparition de mutations [51]), cette voie de signalisation a été décrite comme permettant l'élimination de ces xénobiotiques détectés par le AhR (en tant que ligands) d'où le terme associé de «détoxication». Toutefois, ce modèle doit être nuancé par le fait que certains de ces composés peuvent être transformés par les EMX en des intermédiaires plus réactifs. Le cas le plus classiquement décrit est celui du benzo(a)pyrène (BaP, un HAP) dont le métabolisme par le cytochrome P450 1A1 et l'époxyde hydrolase (deux EMX) conduit à la formation d'un composé intermédiaire diol-époxyde hautement mutagène (d'où le terme associé d'«activation») [52]; cet intermédiaire peut toutefois être pris en charge par des EMX de phase II (dont certaines également régulées par le AhR) ce qui limite sa toxicité. La carcinogénicité du benzo(a)pyrène dépend donc d'un équilibre entre activités et niveaux d'expression de l'ensemble de ces enzymes qui n'est pas équivalent entre deux individus (polymorphismes) [53].

En plus de ce double rôle (détoxication vs activation), certaines EMX peuvent également conduire à l'apparition d'un stress oxydant [54]. Le benzo(a)pyrène (BaP, substrat du AhR et inducteur du CYP1A1) est ainsi un substrat découplant du CYP1A1 : au sein du site actif de l'enzyme, le BaP entraîne dans 70 % des réactions, une utilisation «biaisée» du dioxygène conduisant à la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et à un stress oxydant. Le rôle de ce dernier dans certaines pathologies est clairement évoqué (vieillesse, cancer).

La liaison de certains xénobiotiques à l'AhR permet une détoxification mais peut aussi aboutir à la production de molécules oxydantes et mutagènes.

La toxicité des ligands du AhR dépend donc en grande partie de leur nature chimique. Ainsi, les HAP exercent une grande part de leur toxicité du fait de leur très haute réactivité chimique et par exemple de leur potentiel mutagène. Ce dernier dépend du phénomène d'activation préalablement décrit et donc de la régulation des enzymes impliquées dans cette activation. Le AhR joue donc une part non négligeable dans ces phénomènes. Cela serait d'autant plus intéressant si on considère le cas hypothétique d'un cocktail de xénobiotiques contenant à la fois de bons ligands du AhR (dioxines) et des substrats du CYP1A1 (HAPs) où la présence des dioxines par activation de l'expression des EMX augmenterait considérablement la toxicité des HAPs. Le terme hypothétique doit être nuancé par le fait que la plupart des études menées sur les xénobiotiques ne concernent pas les mélanges (cocktails) alors que ces derniers constituent en fait une réalité environnementale. La présence conjointe des dioxines et des HAPs dans l'environnement est donc loin d'être une simple hypothèse.

La toxicité des ligands du AhR passe également par l'activation simple de ce récepteur comme le montrent les études animales et épidémiologiques sur les effets in vivo des dioxines (stables chimiquement et qui n'exercent leur action que via le récepteur) : chez l'Homme, les données sont certes limitées (études chez des personnes exposées accidentellement ou volontairement) ; une contamination aiguë conduit le plus souvent à une chloracné (manifestation dermatologique) [55]. Des troubles du développement ont été également relevés (minéralisation du squelette, émail dentaire, retard de croissance

intra-utérin ou de développement sexuel, dysfonctions neurologiques) [56]. D'autres effets sanitaires sont également possibles mais restent insuffisamment documentés (hépatotoxicité, troubles du métabolisme lipidique, diabètes, effets immunologiques...) [57]. La formation des cancers reste l'effet le plus controversé d'autant que l'exposition aux dioxines est rarement individuelle et plutôt le fait de cocktails de xénobiotiques. L'International Agency for Research on Cancer (IARC) a classé la dioxine de Seveso comme carcinogène de type I en 1997 (<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol69/mono69-10.pdf>) sur la base des études chez l'animal et de nouvelles données épidémiologiques chez l'Homme mais des études plus récentes semblent contrebalancer cette définition. La dioxine semble exercer un effet notable sur les cancers hématologiques (lymphomes, myélomes) [58]. L'utilisation des modèles animaux a permis de mieux caractériser la toxicité des dioxines (et donc celle liée à l'activation du AhR) : diminution du poids des animaux, hépatotoxicité, inflammation, hyper- ou hypoplasies, atrophie thymique, anomalies du développement (fente palatine), cancérigénicité (notamment chez les rongeurs [59,60]). Plusieurs laboratoires dont le nôtre ont montré que le AhR régule les phénomènes de migration et d'invasion cellulaire [61]. Cela est à mettre en parallèle avec les défauts de développement observés chez les animaux traités par la dioxine, qui impliquent ces phénomènes.

L'ensemble de ces résultats n'est pas facilement transposable à toutes les espèces dont l'Homme en raison des différences d'affinité forte entre les isoformes de récepteurs. De plus, malgré cette caractérisation descriptive des pathologies associées à une exposition aux dioxines, peu de données sont encore connues pour expliquer d'un point de vue mécanistique (rôles des gènes dont l'expression est modulée), cette toxicité induite par le AhR. Une des récentes hypothèses est que l'effet des ligands pourrait aussi être lié à une perturbation des fonctions endogènes du récepteur.

Un rôle endogène pour le AhR ?

Historiquement, le AhR a été décrit comme un récepteur de xénobiotiques mais des observations ou expériences récentes menées dans plusieurs laboratoires laissent entendre que ce dernier est impliqué dans plusieurs autres fonctions biologiques : le récepteur est très conservé entre les espèces et exprimé très tôt au cours du développement embryonnaire dans plusieurs tissus. Toutefois, les arguments les plus convaincants proviennent des modèles de recombinaison homologue ou «Knock out» (KO) : en plus des vertébrés (oiseau, amphibiens, poissons, mammifères), le AhR est exprimé chez les invertébrés comme *Caenorhabditis elegans* (nématode) et *Drosophila melanogaster* (mouche) [62]. Chez *C. elegans*, AhR-1 possède 38 % d'identité (acides aminés) avec le AhR humain dans sa partie N-terminale, impliquée dans la liaison à l'ADN, aux ligands, aux chaperonnes et la dimérisation [63]. Spineless, l'orthologue chez la drosophile, possède 71 % et 45 % d'homologie avec l'isoforme humaine pour les domaines bHLH et PAS, respectivement. À l'inverse des AhR de vertébrés, AhR-1 et Spineless ne lient aucun ligand exogène (TCDD ou β -naphthoflavone) et ne régulent aucune enzyme du métabolisme des xénobiotiques [22]. Un acide aminé (arginine 346) absent du domaine de liaison au ligand chez les isoformes d'invertébrés et présent chez les isoformes de

vertébrés semble être impliqué dans cette spécificité [64]. Cela n'exclut toutefois pas une liaison éventuelle de ligands endogènes. Le reste de la voie de signalisation est conservée avec une hétérodimérisation aux orthologues d'ARNT et une liaison aux XREs. Quel est le rôle du AhR chez les invertébrés si ce dernier ne participe pas au métabolisme des xénobiotiques ?

- chez *C. elegans*, AhR-1 est exprimé spécifiquement dans plusieurs neurones. Chez l'animal KO, plusieurs déficits neurologiques sont ainsi observés (différenciation moins importante, déficit de migration neuronale et d'élongation axonale). Par exemple, Huang et al. ont démontré que AhR-1 est impliqué dans la différenciation GABAergique de motoneurones innervant les muscles de la tête [16]. Sur le plan phénotypique, Qin et al. ont aussi montré le rôle du récepteur dans le comportement social alimentaire du nématode [17,18]. La perte spécifique de AhR-1 dans quatre neurones (AQR, PQR, URXR and URXL qui innervent le pseudocœlome) provoque un déficit de l'aggrégation des vers autour du point de nourriture [63]. Cet effet est lié au contrôle transcriptionnel indirect de AhR-1 sur NRP-1 (un récepteur aux neuropeptides couplés aux protéines G) et plusieurs membres de la famille des guanylate cyclases ;
- chez *D. melanogaster*, Spineless est exprimé dans plusieurs tissus pendant le développement embryonnaire et joue un rôle central dans la morphologie du système nerveux central et l'architecture des ommatidies qui assurent la vision chez cet animal [65]. Duncan et al. montrent que des mutations de Spineless altèrent la différenciation de la région distale de l'antenne (qui est substituée pour un segment distal de jambe).

Indépendamment de sa liaison aux xénobiotiques, AhR joue un rôle dans le développement embryonnaire. L'effet de la présence de xénobiotiques sur cette fonction reste à étudier.

L'ensemble de ces observations prouve que le AhR joue un rôle dans le développement embryonnaire chez les invertébrés. Toutefois, le mécanisme d'activation du récepteur reste mal caractérisé. Certaines interrogations demeurent aussi chez les vertébrés : chez les poissons, plusieurs isoformes sont exprimées (deux à six en fonction des espèces) contrairement aux mammifères [66]. Ainsi, chez le poisson zèbre, il existe trois AhR [66–68] :

- AhR1a qui ne lie pas de ligands exogènes (TCDD ou β -naphtoflavone) et dont la fonction est mal caractérisée. Son expression est spécifique du cerveau, du cœur et de la gonade ;
- AhR1b, récemment identifié (Karchner et al., 2005 [66]), exprimé très tôt dans le développement et proche structuellement et fonctionnellement de la troisième isoforme ;
- AhR2, ubiquitaire et proche fonctionnellement du AhR de mammifères

Ce nombre important d'isoformes est probablement le fait d'une duplication génomique (Hahn et al.). Leur rôle demeure insuffisamment compris dans l'ensemble (redondance, rôle spécifique au sein de l'espèce, conservation des rôles chez les vertébrés). Chez les vertébrés, le gène a été invalidé chez la souris (*Mus musculus*) dans trois laboratoires

indépendants (AhR KO) (exon 1 [domaine basique du bHLH] [69] ; exon 1 [70] ; exon 2 (bHLH) [71]). Ces trois modèles présentent des similarités phénotypiques (résistance à la toxicité de la TCDD, infertilité, développement hépatique anormal, déficit de croissance, anomalies du développement du système cardiovasculaire) et des différences (léthalité importante pour les modèles invalidés au niveau de l'exon 1 avec pour le groupe de F. Gonzalez, un déficit immunitaire conduisant à une surinfection par *Helicobacter pylori* [72]).

Toutes ces études suggèrent que le AhR pourrait être actif en l'absence de ligands exogènes. La découverte de ligands endogènes constitue donc une voie de recherche majeure pour la compréhension des mécanismes régulés par cette protéine. Plusieurs molécules ont été identifiées comme ligands endogènes potentiels : les métabolites de l'acide arachidonique (lipoxanthine A2), de l'hème (bilirubine, biliverdine), du tryptophane (indigoïdes) [4]. Le 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), un dérivé du tryptophane, lie le AhR avec une très haute affinité ($K_d = 0,07$ nM ; $K_d_{TCDD} = 0,48$ nM) [73,74] et active l'expression du cytochrome P450 1A1 (qui le métabolise par ailleurs). FICZ est produit in vivo par l'Homme, des métabolites se retrouvant dans les urines [75]. Sa production par irradiation UV est toutefois locale et rien n'atteste que cette molécule active le AhR dans l'ensemble des tissus de l'organisme. La présence d'autres activateurs a été identifiée dans des échantillons de sérums bovins et humains [65,76,77]. Une étude récente a montré que les LDL oxydés pouvaient activer le AhR tout comme le 7-kétocholestérol (7KC), un produit majeur de l'oxydation du cholestérol agissant comme un antagoniste sur l'induction du cytochrome P450 1A1 par la TCDD [78]. Ces études sont concordantes avec celles démontrant le rôle physiologique du AhR sur le système cardiovasculaire [65,76,77].

Perspectives

Si la toxicité des dioxines et la voie de signalisation du AhR sont bien connues, la « compréhension des mécanismes d'action » du récepteur est encore « loin d'être élucidée ». Cela présente un intérêt pour la compréhension des phénotypes observés en cas d'intoxication mais aussi pour la définition de nouvelles cibles afin de contrer cette toxicité. Une autre difficulté de la recherche en toxicologie est de caractériser précisément les niveaux d'exposition des populations. « La plupart des personnes sont ainsi contaminées de manière chronique, par des mélanges de xénobiotiques, et à faible dose ». Il est difficile de réaliser des modélisations équivalentes sur l'animal chez qui se pose également le problème des différences d'affinité du récepteur. Des modèles de rongeurs exprimant des récepteurs humains (souris humanisées) ont été développés [79] mais leur utilisation reste délicate. De plus, la sensibilité d'une espèce varie grandement en fonction de l'âge. « Un défi majeur en toxicologie est celui de prédire les contaminations » et le niveau de ces dernières (toxicologie « prédictive ») par le développement de biomarqueurs d'exposition et de réponse. Enfin, les récepteurs des xénobiotiques jouent un rôle majeur dans la toxicité de ces derniers. « Une meilleure compréhension de leur mode d'action notamment de leurs fonctions endogènes s'avère nécessaire », ne serait-ce que pour définir si leur liaison à des xénobiotiques conduit à une dérégulation de ces fonctions.

Conclusion

De nombreux hydrocarbures (aromatiques, halogénés...) sont des contaminants de notre alimentation. Les principales familles de ces contaminants sont les dioxines, les furanes, les polychlorobiphényles, les retardateurs de flamme polybromés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzo(a)pyrène). Chez les vertébrés, un grand nombre de ces xénobiotiques lient et activent un récepteur appelé AhR pour *aryl hydrocarbon receptor* qui, via un mécanisme transcriptionnel, régule l'expression de nombreux gènes. Historiquement, des EMX ont été identifiées comme cibles du AhR. Ce mécanisme assure notamment la détoxification de la plupart des xénobiotiques décrits ci-dessus, par augmentation de leur métabolisme. Des études récentes ont montré que cette voie de signalisation pouvait aussi engendrer une toxicité (par exemple, par augmentation du stress oxydant ou par formation de métabolites hautement réactifs vis-à-vis de l'ADN ou des protéines). Par ailleurs, de nouvelles cibles transcriptionnelles du AhR autres que les EMX ont été mises en évidence; ces études ont permis de montrer que le récepteur jouait un rôle important dans la migration cellulaire. L'activation du AhR pourrait ainsi être impliquée dans la dérégulation de phénomènes physiologiques (développement) et physiopathologiques (métastases cancéreuses). Ces observations sont à mettre en parallèle à celles menées sur les fonctions endogènes du récepteur. Des expériences de recombinaison homologue menées sur différents modèles (souris, nématode, drosophile) ont permis de montrer que le AhR en l'absence de ligands, jouait un rôle important dans le développement embryonnaire.

Conflit d'intérêt

Aucun.

Remerciements

Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset); Agence nationale de la recherche (ANR, 06SEST26, Oncopop); Association pour la recherche sur le cancer (ARC); Centre nationale de la recherche scientifique (CNRS); Fondation pour la recherche médicale; Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm); Ligue contre le cancer; ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche; région Île-de-France; université Paris Descartes.

Références

- [1] Flesch-Janys D, Becher H, Gurn P, Jung D, Konietzko J, Manz A, et al. Elimination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons. *J Toxicol Environ Health* 1996;47:363–78.
- [2] Poiger H, Schlatter C. Influence of solvents and adsorbents on dermal and intestinal absorption of TCDD. *Food Cosmet Toxicol* 1980;18:477–81.
- [3] Wolfe WH, Michalek JE, Miner JC, Pirkle JL, Caudill SP, Patterson Jr DG, et al. Determinants of TCDD half-life in veterans of operation ranch hand. *J Toxicol Environ Health* 1994;41:481–8.
- [4] Nguyen LP, Bradfield CA. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 2008;21:102–16.
- [5] Desvergne B, Feige JN, Casals-Casas C. PPAR-mediated activity of phthalates: a link to the obesity epidemic? *Mol Cell Endocrinol* 2009;304:43–8.
- [6] Feige JN, Gerber A, Casals-Casas C, Yang Q, Winkler C, Bedu E, et al. The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPARalpha-dependent mechanisms. *Environ Health Perspect* 2010;118:234–41.
- [7] Kelce WR, Monosson E, Gray Jr LE. An environmental antiandrogen. *Recent Prog Horm Res* 1995;50:449–53.
- [8] Steinmetz R, Young PC, Caperell-Grant A, Gize EA, Madhukar BV, Ben-Jonathan N, et al. Novel estrogenic action of the pesticide residue beta-hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1996;56:5403–9.
- [9] Poland AP, Glover E, Robinson JR, Nebert DW. Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Induction of monooxygenase activities and cytochrome P1-450 formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice genetically "nonresponsive" to other aromatic hydrocarbons. *J Biol Chem* 1974;249:5599–606.
- [10] Burbach KM, Poland A, Bradfield CA. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8185–9.
- [11] Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, et al. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 1991;252:954–8.
- [12] Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 1984;312:752–4.
- [13] Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, Konopka RJ, Kyriacou CP, Rosbash M, et al. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* 1984;39:369–76.
- [14] Sassone-Corsi P. Molecular clocks. Perpetuating the past. *Nature* 1997;389:443–4.
- [15] McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA. Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol* 2010;72:625–45.
- [16] Huang X, Powell-Coffman JA, Jin Y. The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*. *Development* 2004;131:819–28.
- [17] Qin H, Powell-Coffman JA. The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor. AHR-1, regulates neuronal development. *Dev Biol* 2004;270:64–75.
- [18] Qin H, Zhai Z, Powell-Coffman JA. The *Caenorhabditis elegans* AHR-1 transcription complex controls expression of soluble guanylate cyclase genes in the URX neurons and regulates aggregation behavior. *Dev Biol* 2006;298:606–15.
- [19] Wernet MF, Mazzoni EO, Celik A, Duncan DM, Duncan I, Desplan C. Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic for colour vision. *Nature* 2006;440:174–80.
- [20] Dolwick KM, Swanson HI, Bradfield CA. In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8566–70.
- [21] Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Eguchi H, Gotoh O, Kawajiri K. Interindividual difference in expression of human Ah receptor and related P450 genes. *Carcinogenesis* 1994;15:801–6.
- [22] Butler RA, Kelley ML, Powell WH, Hahn ME, Van Beneden RJ. An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. *Gene* 2001;278:223–34.
- [23] Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Backman M, et al. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:12208–13.
- [24] Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, et al. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 1998;92:73–82.
- [25] Escriva H, Delaunay F, Laudet V. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 2000;22:717–27.

- [26] Ema M, Sogawa K, Watanabe N, Chujoh Y, Matsushita N, Gotoh O, et al. cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:246–53.
- [27] Fukunaga BN, Probst MR, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 1995;270:29270–8.
- [28] Petrusis JR, Perdew GH. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact* 2002;141:25–40.
- [29] Heid SE, Pollenz RS, Swanson HI. Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 2000;57:82–92.
- [30] Ramadoss P, Perdew GH. The transactivation domain of the Ah receptor is a key determinant of cellular localization and ligand-independent nucleocytoplasmic shuttling properties. *Biochemistry* 2005;44:11148–59.
- [31] Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* 1999;274:13519–24.
- [32] Whitlock Jr JP. Induction of cytochrome P450A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:103–25.
- [33] Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 2005;28:249–68.
- [34] Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunstrom B, Cook P, Feeley M, et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs. PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 1998;106:775–92.
- [35] Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2006;93:223–41.
- [36] Poland A, Glover E, Kende AS. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* 1976;251:4936–46.
- [37] Gibson R, Wang MJ, Padgett E, Beck AJ. Analysis of 4-nonylphenols, phthalates, and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. *Chemosphere* 2005;61:1336–44.
- [38] Stellman JM, Stellman SD, Weber T, Tomasallo C, Stellman AB, Christian Jr R. A geographic information system for characterizing exposure to Agent Orange and other herbicides in Vietnam. *Environ Health Perspect* 2003;111:321–8.
- [39] Pesatori AC, Consonni D, Bachetti S, Zocchetti C, Bonzini M, Baccarelli A, et al. Short- and long-term morbidity and mortality in the population exposed to dioxin after the “Seveso accident”. *Ind Health* 2003;41:127–38.
- [40] Kiviranta H, Tuomisto JT, Tuomisto J, Tukiainen E, Vartiainen T. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in the general population in Finland. *Chemosphere* 2005;60:854–69.
- [41] Patterson Jr DG, Turner WE, Caudill SP, Needham LL. Total TEQ reference range (PCDDs, PCDFs, cPCBs, mono-PCBs) for the US population 2001–2002. *Chemosphere* 2008;73:S261–77.
- [42] Schecter A, Papke O, Tung KC, Joseph J, Harris TR, Dahlgren J. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the US population: current levels, temporal trends, and comparison with dioxins, dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls. *J Occup Environ Med* 2005;47:199–211.
- [43] Furst P. Dioxins, polychlorinated biphenyls and other organohalogen compounds in human milk. Levels, correlations, trends and exposure through breastfeeding. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:922–33.
- [44] Lignell S, Aune M, Darnerud PO, Cnattingius S, Glynn A. Persistent organochlorine and organobromine compounds in mother's milk from Sweden 1996–2006: compound-specific temporal trends. *Environ Res* 2009;109:760–7.
- [45] Noren K, Meironyte D. Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20–30 years. *Chemosphere* 2000;40:1111–23.
- [46] Todaka T, Hori T, Hirakawa H, Kajiwaru J, Yasutake D, Onozuka D, et al. Congener-specific analysis of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 127 elderly residents in Nakagawa Town, Fukuoka Prefecture, Japan. *Chemosphere* 2008;73:865–72.
- [47] Todaka T, Hori T, Hirakawa H, Kajiwaru J, Yasutake D, Onozuka D, et al. Congener-specific analysis of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 195 pregnant women in Sapporo City, Japan. *Chemosphere* 2008;73:923–31.
- [48] Todaka T, Hirakawa H, Kajiwaru J, Hori T, Tobishi K, Onozuka D, et al. Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood and breast milk collected from 60 mothers in Sapporo City, Japan. *Chemosphere* 2008;72:1152–8.
- [49] Abballe A, Ballard TJ, Dellatte E, di Domenico A, Ferri F, Fulgenzi AR, et al. Persistent environmental contaminants in human milk: concentrations and time trends in Italy. *Chemosphere* 2008;73:S220–7.
- [50] Ashida H, Nishiumi S, Fukuda I. An update on the dietary ligands of the AhR. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4:1429–47.
- [51] Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCBs): mutagenicity and carcinogenicity. *Mutat Res* 1989;220:31–47.
- [52] Stansbury KH, Flesher JW, Gupta RC. Mechanism of aralkyl-DNA adduct formation from benzo[a]pyrene in vivo. *Chem Res Toxicol* 1994;7:254–9.
- [53] Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, Kriek E, Auburtin G, Mayer L, et al. Modulation of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis* 2000;21:35–41.
- [54] Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:316–31.
- [55] Bradshaw TD, Bell DR. Relevance of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) for clinical toxicology. *Clin Toxicol (Phila)* 2009;47:632–42.
- [56] Pelclova D, Urban P, Preiss J, Lukas E, Fenclova Z, Navratil T, et al. Adverse health effects in humans exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Rev Environ Health* 2006;21:119–38.
- [57] Pohjanvirta R, Tuomisto J. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol Rev* 1994;46:483–549.
- [58] Bertazzi PA, Zocchetti C, Guercilena S, Consonni D, Tironi A, Landi MT, et al. Dioxin exposure and cancer risk: a 15-year mortality study after the “Seveso accident”. *Epidemiology* 1997;8:646–52.
- [59] Mann PC. Selected lesions of dioxin in laboratory rodents. *Toxicol Pathol* 1997;25:72–9.
- [60] Courtney KD, Moore JA. Teratology studies with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1971;20:396–403.
- [61] Bui LC, Tomkiewicz C, Chevallier A, Pierre S, Bats AS, Mota S, et al. Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity. *Oncogene* 2009.
- [62] Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 2002;141:131–60.
- [63] Powell-Coffman JA, Bradfield CA, Wood WB. *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2844–9.
- [64] Kudo K, Takeuchi T, Murakami Y, Ebina M, Kikuchi H. Characterization of the region of the aryl hydrocarbon receptor required for ligand dependency of transactivation using chimeric receptor between *Drosophila* and *Mus musculus*. *Biochim Biophys Acta* 2009;1789:477–86.
- [65] McMillan BJ, Bradfield CA. The aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1412–7.

- [66] Karchner SI, Franks DG, Hahn ME. AHR1B, a new functional aryl hydrocarbon receptor in zebrafish: tandem arrangement of *ahr1b* and *ahr2* genes. *Biochem J* 2005;392:153–61.
- [67] Tanguay RL, Andreassen E, Heideman W, Peterson RE. Identification and expression of alternatively spliced aryl hydrocarbon nuclear translocator 2 (ARNT2) cDNAs from zebrafish with distinct functions. *Biochim Biophys Acta* 2000;1494:117–28.
- [68] Tanguay RL, Abnet CC, Heideman W, Peterson RE. Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor. *Biochim Biophys Acta* 1999;1444:35–48.
- [69] Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 1995;268:722–6.
- [70] Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 2003;1619:263–8.
- [71] Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:6731–6.
- [72] Fernandez-Salguero PM, Ward JM, Sundberg JP, Gonzalez FJ. Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol* 1997;34:605–14.
- [73] Rannug A, Rannug U, Rosenkranz HS, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, et al. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem* 1987;262:15422–7.
- [74] Wei YD, Helleberg H, Rannug U, Rannug A. Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem Biol Interact* 1998;110:39–55.
- [75] Wincent E, Amini N, Luecke S, Glatt H, Bergman J, Crescenzi C, et al. The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem* 2009;284:2690–6.
- [76] Conway DE, Sakurai Y, Weiss D, Vega JD, Taylor WR, Jo H, et al. Expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human endothelial cells: regulation by fluid shear stress. *Cardiovasc Res* 2009;81:669–77.
- [77] Savouret JF, Berdeaux A, Casper RF. The aryl hydrocarbon receptor and its xenobiotic ligands: a fundamental trigger for cardiovascular diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2003;13:104–13.
- [78] Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF. 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 2001;276:3054–9.
- [79] Flaveny CA, Perdew GH. Transgenic humanized AHR mouse reveals differences between human and mouse AHR ligand selectivity. *Mol Cell Pharmacol* 2009;1:119–23.

Articles annexes 1 : Aryl Hydrocarbon Receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin

Auteurs: Stephane Pierre, Aline Chevallier, Fatima Teixeira-Clerc, Ariane Ambolet-Camoit, Linh-Chi Bui, Anne-Sophie Bats, Jean-Christophe Fournet, Martine Aggerbeck, Sophie Lotersztajn, Robert Barouki, Xavier Coumoul

Article en révision dans Hepatology

VIII. Induction d'une fibrose hépatique dépendante du AhR chez les souris traitées par la dioxine

Article soumis à Hepatology le 29 septembre 2012.

A. Contexte scientifique

Au cours de ma première année de thèse, j'ai participé à une étude portant sur les effets d'un traitement de la TCDD sur le foie de souris (en parallèle des études transcriptomiques menées sur le cervelet). Ce travail a rapidement conduit à des résultats particulièrement intéressants dans le cadre de l'hypothèse de la perturbation endogène. Ceux-ci concernent l'apparition d'une fibrose hépatique chez les souris exposées à la TCDD. En effet, de précédentes études menées chez les souris $AhR^{-/-}$ (modèle $AhR_{\Delta 1/1}$ Gonzalez et $AhR_{\Delta 2/2Bra}$) ont montré une altération du foie, caractérisée par une fibrose portale (chapitre I.B.7) (Corchero *et al.*, 2004, Lahvis *et al.*, 2000) (Figure 41).

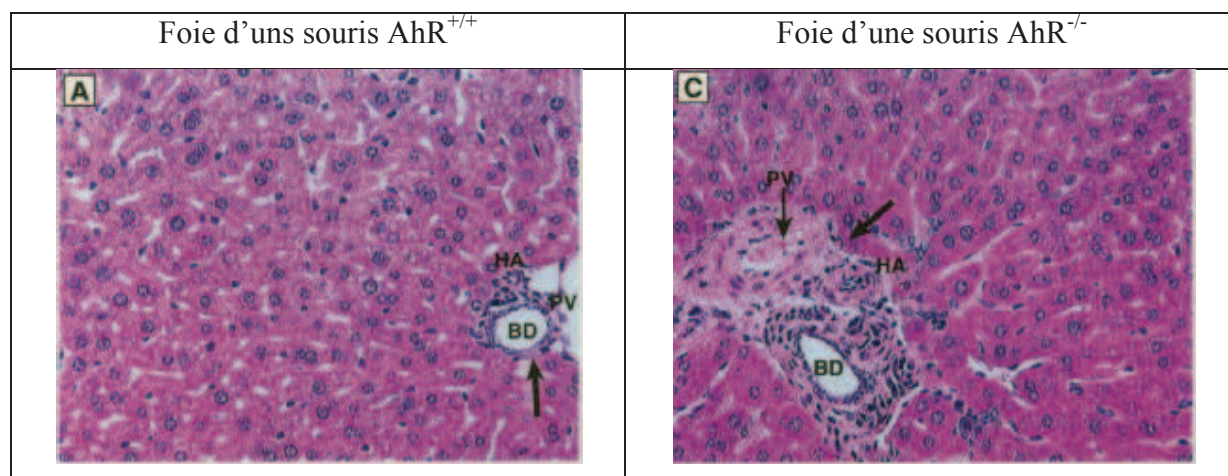


Figure 41 : Histologie du foie d'une souris $AhR^{+/+}$ (à gauche) et d'une souris $AhR^{-/-}$ (à droite).

Comparativement au foie de la souris $AhR^{+/+}$ (gauche), la présence d'une fibrose modérée est observée (flèches) chez la souris $AhR^{-/-}$ (droite). HA : artère hépatique, PV : veine portale, BD : canaux biliaires (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995).

La fibrose portale résulte d'une inflammation chronique de l'espace porte²⁷ du foie. C'est un processus de défense de l'organisme suite à une lésion, une intoxication à l'alcool,

²⁷ Le foie est divisé en lobules centrés par une veine centro-lobulaire et limités en périphérie par les espaces portes qui sont constitués d'une ou plusieurs sections de canal biliaire, veine porte et artère hépatique.

une infection par un virus hépatique ou bien l'exposition à des toxiques. Elle se caractérise par le dépôt de molécules spécifiques d'un tissu mésenchymateux comme le collagène de type I, qui vont progressivement remodeler et détruire l'architecture du tissu sain. Une fois que la fibrose est établie, la physiologie du tissu hépatique peut soit revenir à son état initial, soit évoluer en cirrhose (pathologie irréversible). Plusieurs acteurs sont responsables de cette fibrose. Parmi eux, le TGF β (« Transforming Growth Factor beta ») a un rôle majeur dans l'induction de cette pathologie. Des concentrations élevées de TGF β ont été observées dans l'espace péri-portal et dans les hépatocytes des souris AhR^{-/-} (Zaher et al., 1998).

Les cellules responsables de la sécrétion de TGF β sont des myofibroblastes activés. Leur origine reste mal connue et plusieurs types cellulaires sont candidats. Un des mécanismes impliqués dans la formation des myofibroblastes activés pourrait être la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Choi et al., 2010). La transition épithélio-mésenchymateuse est la conversion de cellules épithéliales en cellules mésenchymales. Elle est impliquée dans différents processus physiologiques dont la formation de l'axe médian au cours du développement embryonnaire. Cependant, elle peut contribuer aussi à la fibrose de certains organes et à la progression cancéreuse en stimulant les propriétés migratoires et invasives des cellules (Thiery et al., 2009). Il existe également un phénomène opposé, la transition mésenchymo-épithéliale (TME). Dans le foie, les hépatocytes et les cholangiocytes²⁸ pourraient subir une TEM et ainsi former des myofibroblastes (Ikegami et al., 2007). Cependant, plusieurs observations laissent supposer que les cellules étoilées hépatiques (HSC), localisées dans l'espace de Disse, seraient les plus sujettes à devenir des myofibroblastes et à produire une fibrose (Ikegami *et al.*, 2007) (Figure 42).

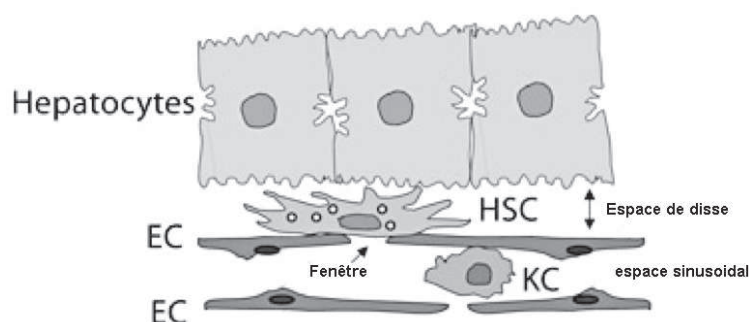


Figure 42 : Représentation schématique des différents types cellulaires impliqués dans le développement de fibrose hépatique.

HSC : cellules étoilées hépatiques, EC : cellules endothéliales, KC : cellules de Kupffer²⁹ (Adapté de (Ikegami et al., 2007).

²⁸ Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales localisées dans les canaux biliaires.

²⁹ Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie

Différentes études *in vitro* dont certaines menées au laboratoire, ont démontré que la TCDD, *via* le AhR, augmente l'expression de gènes impliqués dans les processus de migration et de TEM (Bui *et al.*, 2009, Carvajal-Gonzalez *et al.*, 2009b, Tomkiewicz *et al.*, 2012).

Nous avons, avec le Dr Stéphane Pierre, pris en charge les protocoles de gestion et de traitement des souris par la TCDD (voir partie ci-dessous « B. Buts de l'étude ») et étudié en parallèle, l'expression de plusieurs gènes de la TEM (Stéphane Pierre) et de plusieurs marqueurs de l'inflammation et de la fibrose hépatique (ma contribution) dans le cadre de l'hypothèse de la « perturbation endogène » présentée préalablement.

B. Buts de l'étude

Pour cette étude, nous avons injecté de la TCDD ou son véhicule (huile de maïs) par voie intra-péritonéale à des souris mâles C57BL/6J âgées de 8 semaines suivant deux protocoles différents :

- 2 injections de 25 µg/kg de TCDD à 1 semaine d'intervalle et sacrifice des animaux 1 semaine après la seconde injection (15 jours de traitement)
- 6 injections de 25 µg/kg de TCDD, une fois par semaine et sacrifice des animaux, 1 semaine après la dernière injection (7 semaines de traitement)

Nous avons entrepris une analyse histologique du foie et démontré la présence d'une fibrose portale. En parallèle, nous avons étudié l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la fibrose hépatique par qPCR et Western Blot.

C. Résumé en français

Le rôle des polluants environnementaux dans des phénomènes pathologiques tels que l'induction d'une fibrose hépatique est très peu étudié. *In vitro*, des études suggèrent que la TCDD et d'autres ligands du AhR augmentent l'expression de plusieurs gènes induits lors de la fibrose hépatique. Le but de cette étude était de déterminer par quel mécanisme les polluants, ligands du AhR, pouvaient induire une fibrose hépatique.

Pour cela, des souris C57BL/6J ont été traitées par de la TCDD (25 µg/kg) ou son véhicule (huile de maïs) pendant 2 ou 6 semaines et l'expression des gènes (qPCR et Western blot) ainsi que l'histologie du foie, ont été étudiées pour chaque traitement.

Nous avons démontré que le traitement des souris par la TCDD durant 2 semaines modifie l'expression de marqueurs pro-fibrotiques tels que le collagène de type I et l' α SMA (« α -SMooth Actin »). A la suite du traitement de 6 semaines, des altérations structurales du foie des souris sont observées (fibrose avec présence de collagène de type I et d'actine type SMA). En parallèle, les niveaux d'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α) et de marqueurs des fibroblastes activés sont augmentés. De plus, l'expression de certains membres de la voie du TGB- β comme le TGF- β lui-même et ZEB2 (« zinc finger E-box binding homeobox 2 »), est augmentée et corrélée avec la diminution du niveau d'expression du micro-RNA, miR-200a. Nous avons également exploré l'hypothèse de la présence d'une transition épithélio-mésenchymateuse dans le foie des souris traitées. La mesure de l'expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, a permis de mettre en évidence l'augmentation de deux membres de la famille Snai et de leurs cibles, des métalloprotéases (MMP-2 et MMP9) et la vimentine. De plus, on observe la diminution de l'E-cadhérine et de la claudine 1, marqueurs épithéliaux.

En conclusion, la TCDD, ligand du AhR, induit une fibrose hépatique chez les souris en régulant directement des différentes voies de signalisation pro-fibrotiques. Ce phénotype rappelle les observations effectuées avec les souris AhR KO et renforce l'hypothèse que la fibrose induite par la TCDD résulte d'une perturbation de la fonction endogène du AhR au niveau hépatique. Ces travaux sont à mettre en parallèle de ceux auxquels j'ai participé pour caractériser les mécanismes de régulation de la TEM par les polluants (Bui *et al.*, 2009).

Title: Aryl hydrocarbon Receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin

Short title: AhR regulation of fibrosis *in vivo*

Authors: Stéphane Pierre ^{1,2,*}, Aline Chevallier ^{1,2,*}, Fatima Teixeira-Clerc⁵, Ariane Ambolet-Camoit ^{1,2}, Linh-Chi Bui ^{1,2}, Anne-Sophie Bats ^{1,2,3}, Jean-Christophe Fournet ⁴, Martine Aggerbeck ^{1,2}, Sophie Lotersztajn⁵, Robert Barouki ^{1,2,6}, Xavier Coumoul ^{1,2,†}

¹ INSERM UMR-S 747, Toxicologie Pharmacologie et Signalisation Cellulaire, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris France

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité

³ AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Chirurgie Gynécologique Cancérologique, Paris France

⁴ AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, service d'anatomo-pathologie, Paris, France

⁵ IRMB, INSERM U955, Hopital Henri Mondor, 94010 Creteil, France

⁶ AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, service de biochimie métabolique, Paris, France

^{*}, both authors contribute equally to this work

Grant support: this work was supported by ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail); the ANR (Agence Nationale de la Recherche, 06SEST26, Oncopop); ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer, 3927 & SFI20101201842); the CNRS (Centre National de la recherche scientifique, Martine Aggerbeck); the Fondation pour la Recherche Médicale (Bourse post-doctorale, Linh-Chi Bui); INCa (Institut National du Cancer) ; INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; all authors); the Ligue contre le Cancer (Bourse post-doctorale, Linh-Chi Bui); the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (Bourse doctorale, Aline Chevallier, Ariane Ambolet-Camoit); the Région Ile de France (bourse doctorale, Stéphane Pierre); the Université Paris Descartes.

Abbreviations: Aryl hydrocarbon Receptor (AhR); TetraChloroDibenzo-p-Dioxin (TCDD)

[†] **Address correspondence to:** Xavier Coumoul, INSERM UMR-S 747, 45 rue des Saints Pères 75006 Paris France;

Phone: +33 1 42 86 33 59; Fax : +33 1 42 86 38 68; E-mail: xavier.coumoul@parisdescartes.fr

Writing assistance: we thank Dr Lawrence Aggerbeck for his critical reading of this manuscript.

Author contributions: Stéphane Pierre & Aline Chevallier were involved in the study concept and design and statistical analysis; Stéphane Pierre was involved in drafting of the manuscript; Stéphane Pierre, Aline Chevallier, Fatima Teixeira-Clerc, Ariane Ambolet-Camoit, Linh-Chi Bui, Anne-Sophie Bats, Jean-Christophe Fournet were involved in the acquisition of data, analysis and interpretation of data; Fatima Teixeira-Clerc, Martine Aggerbeck, Sophie Lotersztajn, Pedro Fernandez-Salguero, Robert Barouki were involved in critical revision of the manuscript for important intellectual content ; Fatima Teixeira-Clerc, Martine Aggerbeck, Sophie Lotersztajn, Robert Barouki, Xavier Coumoul were involved in obtained funding ; Martine Aggerbeck, Robert Barouki and Xavier Coumoul were involved in study supervision.

Abstract

Background & Aims: The contribution of environmental pollutants to liver fibrosis is an important and poorly explored issue. *In vitro* studies suggest that the environmental pollutant, 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), and other Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) ligands induce several genes that are known to be up-regulated during liver fibrosis. Our aim was to determine whether exposure to such pollutants can lead to liver fibrosis and to characterize the mechanisms of action.

Methods: Mice were treated with TCDD at different times (25 µg/kg during either 2 or 6 weeks). Gene expression *in vitro* and *in vivo* (quantitative RT-PCR, western blot) as well as liver histology, were investigated for each treatment.

Results: treatment of mice with 25 µg/kg TCDD for 2 weeks modified the hepatic expression of fibrotic markers (collagen 1a1 and alpha-smooth actin). Following 6 weeks of treatment, histological features of mouse hepatic fibrosis became apparent. In parallel, the levels of inflammatory cytokines (such as IL1β or TNF-alpha) and of markers of activated fibroblasts were found to be up-regulated. Interestingly, we also found increased expression of members of the TGFβ pathway (TGFβ, ZEB2) and a concomitant decrease of miR-200a levels. We also explored the hypothesis that hepatocytes undergoing epithelial-mesenchymal transition (EMT) directly or indirectly contribute to liver fibrosis progression. We measured the expression of several epithelial and mesenchymal markers: two members of the Snail family were increased, whereas their target, the epithelial marker E-cadherin and Claudin1, was decreased. Further, the expression of mesenchymal markers (MMP-2, MMP-9, vimentin) were increased. We also confirmed that Snai2 is a direct transcriptional target of TCDD in the human hepatocarcinoma cell, HepG2.

Conclusions: The AhR ligand, TCDD, induces mouse hepatic fibrosis by directly regulating profibrotic pathways.

Keywords: dioxin; mice; AhR; liver diseases; inflammation

Introduction

Alcohol abuse and non-alcoholic fatty liver diseases are among the predominant causes of chronic liver diseases (CLD) together with viral hepatitis. Schematically, these conditions generate injuries of the hepatic tissue thereby leading to inflammation and to liver fibrogenesis. Progression of fibrosis disrupts the liver architecture ultimately leading to cirrhosis, life-threatening liver failure, portal hypertension and to hepatocellular carcinoma. It is generally accepted that liver fibrosis is the consequence of a sustained wound healing response to chronic liver injury. It is characterized by an abnormal accumulation of extracellular matrix (ECM) of altered composition that results from both an increased production and a reduced degradation of collagen fibers (1, 2). Fibrosis is the consequence of an intense proliferation and accumulation of hepatic myofibroblasts; these cells originate from different populations, among which are activated hepatic stellate cells (HSC), portal fibroblasts and bone marrow-derived cells. However, recent investigations have suggested that hepatocytes undergoing epithelial-mesenchymal transition (EMT) directly or indirectly contribute to liver fibrosis progression (3-5). Indeed, several clinical and experimental studies have shown that hepatocyte death associated with chronic liver injury is one of the initial steps leading to fibrosis (6-8). Moreover, cultured primary hepatocytes or hepatocyte cell lines that are treated with transforming growth factor β (TGF β), display significant reversion of their epithelial phenotype, and acquire characteristics of mesenchymal cells (9). *In vivo* studies using rodents and lineage-tracing experiments also indicate that liver fibrosis might involve an epithelial mesenchymal transition (EMT) of hepatocytes (3-5) but these conclusions remain controversial (10).

Although several epidemiological studies suggest that the progression of chronic liver diseases to fibrosis is enhanced by environmental factors including cigarette smoke (11-14). The underlying mechanisms of action are poorly understood. In particular, it is unclear whether fibrosis risk enhancement results from the liver toxicity of cigarette smoke chemicals, from indirect systemic effects, such as insulin resistance, or from a more targeted effect of some of these chemicals on the fibrogenic pathways. In addition, these observations raise a more general question as to whether environmental pollutants contribute to chronic liver diseases. One way to address this issue is to explore the effects of xenobiotic signalling pathways on the biological targets associated with the development of fibrosis described above. One of the most important receptors of environmental chemicals is the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) (15) which is a cytosolic, ligand-activated transcription factor. The AhR has a very large repertory of ligands, including environmental pollutants such as dioxins, furans and polychlorinated biphenyls (PCBs) as well as several polyaromatic hydrocarbons present in

cigarette smoke. Upon activation, the AhR translocates into the nucleus where it forms a heterodimeric complex with the AhR Nuclear Translocator (ARNT). This complex binds to specific Xenobiotic Responsive Elements (XRE consensus core: 5'-GCGTG-3') and induces the transcription of specific target genes including xenobiotic metabolizing enzymes (XME) such as the cytochrome P450 (CYP) 1 family (15). In addition to detoxification functions, recent *in vitro* studies, including our own, have shown that activation of the AhR elicits diverse cellular responses such as the alteration of cellular morphology and migration and the induction of EMT markers (16-19) (20). These cellular alterations could mediate part of the long-term toxicity of the AhR ligands in humans and animals (21-23) (24). One of the most potent AhR ligand is 2,3,7,8-TetraChloroDibenzoDioxin (TCDD), an environmental, highly persistent, toxin and a prototypical AhR activator. Both in humans and in animals, exposure to TCDD leads to several toxic effects such as chloracne, wasting syndrome, teratogenicity, immunotoxicity, neurotoxicity, tumor promotion, carcinogenesis and also alteration of liver functions (25-32) (33). Therefore, we hypothesized that activation of the AhR could trigger biological pathways associated with liver fibrosis. In the present work, we show, for the first time, that the AhR ligand and environmental pollutant, TCDD, regulates several fibrosis, inflammatory, epithelial and mesenchymal markers in mouse liver and that exposure to TCDD leads to liver fibrosis.

Materials and methods

Animals, treatments and tissue extraction. The animal treatment protocol was submitted to a bioethical committee (n° CEEA34.MA.003.12). Male mice (7 weeks old) were injected i.p. once with 200µL of either TCDD (25 µg per kg of body weight) or the vehicle (corn oil). TCDD was purchased from LCG Promochem (Molsheim, France). Subchronic treatment consisting of two i.p. injections of TCDD (25 µg/kg b.w.) or corn oil at day 0 and day 7 were performed and mice were sacrificed at day 14. Longer treatment consisting of six i.p. injections of TCDD (25 µg/kg b.w.) or corn oil at day 0, 7, 14, 21, 28, and day 35 were also performed and the mice were sacrificed at day 42. The livers were removed immediately and frozen in liquid nitrogen.

Histology and immunohistochemistry. Livers were fixed with paraformaldehyde (PFA)-4% and paraffin embedded. Tissue sections (thickness: 4 µm) were stained with hematoxylin-eosin or picro-sirius red for visualization of hepatic collagen. Immunostaining of smooth muscle α -actin (α -SMA) was performed using the Vector M.O.M immunodetection kit (Vector Laboratories) and a monoclonal antibody directed against α -SMA (Sigma, 1:1000 dilution). Detection was performed with the UltraVision LP detection kit (Thermo Scientific) using metal-enhanced diaminobenzidine (DAB) substrate (Thermo Fisher). Slides were counterstained with aqueous hematoxylin.

RNA and miRNA extractions from liver tissue. Thirty mg of liver tissue were used for the extraction. One mL of trizol (Invitrogen) and 2 stainless steel beads (Qiagen) were used to crush the sample (3 minutes, 25 Hertz). After 5 minutes of incubation at room temperature, 200 µL of chloroform were added. The samples were vortexed and centrifuged at 12,000 rpm for 15 minutes at 4°C. For the RNA samples, one volume of ethanol 70% was added to the upper phase. Finally, total mRNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen) as described by the manufacturer. For the miRNA samples, one volume of isopropanol was added to the upper phase, samples were vortexed and then centrifuged at 12,000 rpm for 30 minutes at 4°C. Pellets were washed with one volume of ethanol 70% and centrifuged 15 minutes at 12,000 rpm for another 30 minutes at 4°C. Pellets were air-dried at room temperature for a few minutes. DNase I (RNase-Free DNase set, Qiagen) treatment at 37°C for 15 minutes was performed. Finally, total RNA were dissolved in sterile water.

Cell Culture and chemicals. Human hepatocarcinoma HepG2 cells (ATCC #HB-8065) were cultured as described previously (16). The day before treatment with TCDD, the cells were cultured in DMEM without phenol red and supplemented with 3% charcoal-treated (deteroidized) fetal calf serum. Cells were maintained in this medium during the experiments. Typically, the cells were treated or not with 25 nM TCDD.

RNA extraction from cell cultures. Total RNA were extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen) as previously described (16).

Reverse transcription and quantitative RT-PCR of mRNA. Reverse transcription was performed on RNA samples (1 µg) using the cDNA High-Capacity Archive kit from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France) in a 50 µL-final reaction volume according to the manufacturer's instructions. Specific oligonucleotides were designed using the OLIGO Explorer software (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO). Gene specific primers used for real time PCR were:

mAhR: forward 5'-AGGACGAGAGCATTTACAGAAG-3' and reverse 5'-GAAGGAGGACACAGAT-3'

mCCR5: forward 5'-CGTAGAGTCAGCAGAACTTGG-3' and reverse 5'-CGGTGTGGTAGGATTAGGTC-3'

mClaudin1: forward 5'-GGTCTGGCGACATTAGTGG-3' and reverse 5'-GGGTAAGAGGTTGTTTCCG-3'

mCollagen-type-Ialpha1: forward 5'-TCATCGTGGCTTCTCTG-3' and reverse 5'-CGTTGAGTCCGTCTTTG-3'

mCYP1A1: forward 5'-ATGAGTTGGGGAGGTTACTG-3' and reverse 5'-AATGAGGCTGTCTGTGATGTC-3'

mE-cadherin: forward 5'-GGCTGGACCGAGAGAGTTAC-3' and reverse 5'-GGCACTTGACCCTGATACG-3'

mFSP1: forward 5'-GACAGCAACAGGGACAATG-3' and reverse 5'-GCGAAGAAGCCAGAGTAAGG-3'

mGAPDH: forward 5'-GTGGACCTCATGGCCTACAT-3' and reverse 5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'

mIL1beta: forward 5'-GCCACCTTTTGACAGTGATG-3' and reverse 5'-TCTCCACAGCCACAATGAG-3'

mMCP1: forward 5'-AGGTCCTGTCATGCTTCTG-3' and reverse 5'-GCTGCTGGTGATCCTCTTGT-3'

mMMP2: forward 5'-TGGCATCGCTCAGATCCGTG-3' and reverse 5'-GAGCTCAGGCCAGAATGTGG-3'

mMMP9: forward 5'-CATTCGCGTGGATAAGGAGT-3' and reverse 5'-CACTGCAGGAGGTCGTAGGT-3'

mRasGRP1: forward 5'-CAAAGGATGGTGGATTCTG-3' and reverse 5'-TCTCGTCTCTGCTGATGAG-3'

mSnai1: forward 5'-GTTGGAGCGGTGAGCAAAAG-3' and reverse 5'-GTCTGCACGACCTGTGGAAAG-3'

mSnai2: forward 5'-CCTTTCTCTTGCCCTCACTG-3' and reverse 5'-ACAGCAGCCAGACTCCTCAT-3'

mTNFalpha: forward 5'-GGGGGCTCCAGAACTC-3' and reverse 5'-GGGCTACAGGCTTGTCAC-3'

mVimentin: forward 5'-CCCTGAACCTGAGAGAAAC-3' and reverse 5'-ATCGTGATGCTGAGAAGTC-3'

hSnai2: forward 5'-CTCCCCGTGTGAGTTCTAA-3' and reverse 5'-AGCTACCCAATGGCCTCTCT-3';

hRPL13A: forward 5'-CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3' and reverse 5'-GAGGACCTCTGTATTTGTCAA-3'.

Oligonucleotides were obtained from Eurogentec (Les Ulis, France). Quantitative RT-PCR measurements were performed on an ABI Prism 7900 Sequence Detector system (Applied Biosystems) as described by Bui et al (16). The relative mRNA levels were estimated using the delta-delta Ct method with RPL13A as the reference for human samples and GAPDH for the mouse samples.

Reverse transcription and quantitative RT-PCR of miRNA. Reverse transcription and qRT-PCR were performed using the NCode miRNA First-Strand cDNA synthesis and qRT-PCR kits (Invitrogen). Specific forward miRNA primers were designed according to the manufacturer's instruction for the miRNA 200 family. These primers were:

mi200a: 5'-TAACACTGTCTGGTAACGATGT-3'; mi200b: 5'-TAATACTGCCTGGTAATGATG-3'; mi200c: 5'-TAATACTGCCGGGTAATGATGGA-3'; mi141: 5'-TAACACTGTCTGGTAAAGATGG-3'; mi429: 5'-TAATACTGTCTGGTAAACCGT-3'. Quantitative RT-PCR measurements were performed on an ABI Prism 7900 Sequence Detector system (Applied Biosystems) as described by Bui et al (16).

Protein extraction and immunoblotting. Forty mg from each tissue were extracted with 1.2 mL of T-PER® (Invitrogen) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma) and 3 tungsten beads (Qiagen) to crush each sample (3 minutes, 25 Hertz). Total proteins (10 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose Hybond C-extra membranes (GE Healthcare). Blots were probed with primary antibodies recognizing human Slug (Cell Signaling, 9585, dilution 1:500), mouse Snai1 (Abcam, ab95931, dilution 1:1000), mouse E-cadherin (Cell Signaling, 4065, dilution 1:2000), mouse Vimentin (Sigma, V4630, dilution 1:10000), mouse FSP1 (Abcam, ab27957, dilution 1:1000), mouse actin (Abcam, ab37063, 1:10000) or human actin (Abcam, ab37063, 1:10000). Immunopositive bands were visualized on X-ray films using an alkaline phosphatase-linked secondary antibody (Applied Biosystems, T2191 or T2192, 1:10000) and an enhanced chemiluminescence system CDP-Star® (Applied Biosystems). Quantification was performed with ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Gelatin zymography. Proteins were extracted from the tissues as described for immunoblotting, except that protease inhibitors were omitted. Samples (10 µg) were electrophoresed on a 1 mg/ml Gelatine-acrylamide-SDS gel (16). The gel was then incubated at 37°C overnight in an incubation buffer (50mM Tris-HCl pH7.4, 5mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, 1µM ZnCl₂, 0.015% Brij 35, 2.5% Triton X100). After the incubation, the gel was stained with Coomassie blue for 1 hour and destained with 10% Acetic acid, 40% methanol for 1 hour at room temperature and then with 10% acetic acid, 5% methanol for an additional hour. A clear zone of gelatin digestion showed the matrix metallo-protease activity. Finally, the gel was scanned, using a Canoscan Lide 500F.

ELISA cytokine assay. Proteins were extracted from the livers and prepared according to the manufacturer's protocol (Procarta cytokine assays, Panomics, Affymetrix). Equal amounts of total proteins (10 µg) were mixed with antibody-conjugated beads for 30 minutes; a detection antibody was added for another 30 minutes, then Streptavidin-Phycoerythrine (PE) for 30 minutes. Finally, using a Luminex instrument (Luminex 200 Total System, Plateau technique de biochimie et de Métabolisme, Centre des Cordeliers), we measured the quantity of nine different cytokines and chemokines.

Chromatin Immunoprecipitation assay. HepG2 cells were seeded into 150-mm-diameter dishes (approximately 20x10⁶ cells per dish) 48h before being treated or not with 25 nM TCDD for 15, 45 or 75 min. The cells were then processed for the ChIP assay as previously described (16). The XRE site is located between -248 and -243 bp but it was impossible to design primers, which encompass the XRE; therefore, we designed two different constructs close to the XRE region to perform the ChIP experiments. ChIP DNA was analyzed by quantitative PCR using specific primers covering the sequences between **-239 bp and +4 bp** of the human Slug promoter region, located downstream of the XRE (forward primer: 5'-TCACCGAGCGAGGTTAC-3' and reverse primer 5'-AACTGAGCCCGTTTGG-3') and the region between **-195 bp and -48 bp** of the human Slug promoter region just after the XRE (forward primer: 5'-AAACAGCCCATTTGAACC-3' and reverse primer 5'-GGCTAAGGATTCAGCAGCA -3').

Statistical analysis. The results are expressed as the mean ± standard deviation of at least three different experiments. Differences between groups were analyzed by U Mann-Whitney's test (non-parametric

comparison of 2 independent series) or H Kruskal-Wallis's test (non-parametric comparison of k independent series). A p-value < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

TCDD stimulates liver fibrosis.

Since several epidemiological studies suggest that environmental factors including cigarette smoke might enhance fibrosis, we treated mice for a short period of exposure (2 weeks) with TCDD (1 injection per week), an environmental pollutant and a ligand of the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) and measured the expression of two fibrosis markers in the liver (collagen 1 α 1, alpha-smooth muscle actin). Collagen 1 α 1 is a matrix component which is increased in several pathological conditions, including fibrosis and cancer (2, 34). Quantitative RT-PCR showed increased levels of both markers (Figure 1A). We next examined the liver histology of these mice and observed an increased cellular infiltration at the periphery of the portal veins (Figure 1B) but without significant signs of fibrosis despite the associated increase in expression of fibrotic markers genes. Therefore, we investigated whether the increased expression of the fibrotic marker genes could lead to fibrosis after longer periods of exposure. Quantitative RT-PCR of liver mRNA showed levels of both fibrosis markers greater than that observed 14 days after treatment with two doses of TCDD (Figure 1A). Treatment with 25 μ g/kg/week TCDD for 5 weeks (injections on days 0, 7, 14, 21, and 28) lead to a morphological change of the liver surface (loss of color, granular surface and presence of white dots). At the tissue level, TCDD increased both alpha-smooth muscle actin and collagen in liver slices and led to histological features evocative of liver fibrosis (Figures 1B), indicating that subchronic exposure to TCDD stimulated fibrosis.

TCDD stimulates liver inflammation.

Since we observed an increased cellular infiltration at the periphery of the veins upon 2 weeks of treatment with TCDD (Figure 1B), we also measured the liver expression of several inflammatory cytokines which stimulate fibrosis (35). After only two weeks of treatment, *IL1 β* , *MCP1* and *TNF α* , were increased by treatment with TCDD (10-, 11- and 12-fold, respectively, Figure 2A). In addition, the amounts of IL1 β and MCP1 proteins were increased (3-fold and 9-fold, respectively Figure 2B). We also quantified the level of Fibroblast Specific Protein 1 (FSP1) (36), which is a marker of activated fibroblasts (37). In the WT mice, liver *FSP1* mRNA levels were increased (4-fold) 14 days after treatment with TCDD (Figure 3A). In parallel, there was a 2-fold increase of the FSP1 protein (Figure 3B). Further, we found that, following TCDD treatment, there was an increase in the expression of TGF β (6.3 fold), an inducer of fibrosis, as well as in one of its target genes, *ZEB2* (4.8 fold) (Figure 4A). Recently, it has been shown that TGF β inhibits the expression of several members of the

microRNA 200 family. These miRNA are critical inhibitory regulators of *ZEB2* expression. Thus, we measured the expression level of the five members of the miR200 family (200a, 200b, 200c, 141, 429) in the livers of treated and untreated mice. The miRNA 200a level was significantly and specifically reduced (51%) in TCDD-treated mice, Figure 4B).

Finally, several fibrosis and inflammatory markers were quantified by RT-PCR after 6 weeks of exposure to TCDD and were shown to be induced by this regimen (Table 1). In several cases, the induction level was higher than in the 2-weeks time point.

These results strongly suggest that exposure to TCDD induces both liver inflammation and fibrosis molecular markers.

Epithelial and mesenchymal markers are regulated by TCDD *in vivo*.

Recent studies also showed that a significant number of fibroblasts might be derived from hepatocytes in advanced stages of fibrosis suggesting an epithelial mesenchymal transition (EMT) (5). The EMT is currently believed to be a key event in developmental processes and tumor progression. The transition is characterized by the loss of the expression of epithelial markers, including adhesion proteins such as E-Cadherin, which, ultimately, leads to cell migration and the generation of new adhesion profiles following the induction of mesenchymal markers. Several transcription factors have been identified as critical regulators of the EMT including the proteins of the Snail family (38, 39). These proteins bind to the E-Cadherin promoter and act as transcriptional repressors (40). In addition to E-cadherin, several members of the claudin family are also down-regulated by Snail family members (38, 41, 42). In contrast, the transcription of mesenchymal markers, such as vimentin, as well as key actors involved in the invasion process, such as matrix metalloproteases or MMPs, are transcriptionally activated.

We studied the expression of epithelial and mesenchymal markers in the livers of 2-weeks-treated mice. The levels of mRNA of two members of the Snail family, *mSnai1* and *mSnai2*, were significantly increased (6.5 and 2.0 fold respectively, Figure 5A, left) whereas the levels of mRNA of their targets, *mE-cadherin* and *mClaudin1*, were significantly decreased (50% and 80% respectively, Figure 5B, left). In parallel, the amount of mSnai1 protein was increased approximately 1.6 fold after TCDD treatment as compared to untreated mice (Figure 5A, right) whereas a 2-fold decrease in the mE-cadherin protein level was observed (Figure 5B, right).

We next studied the effect of TCDD on mesenchymal markers. The matrix metalloproteases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9), two gelatinases, are involved in the degradation and remodeling of the extracellular matrix (43). The levels of both *MMP-2* and *MMP-9* mRNA increased 5- and 8-fold, respectively, following treatment with TCDD (Figure 6A, left). We measured the activity of these enzymes by gelatine zymography and found that the activities of both enzymes were enhanced (2- and 4-fold, respectively) following treatment with TCDD (Figure 6A, right). Vimentin is a member of the intermediate filament family of proteins, which plays an important role in the structure of connective tissues (44) and which is highly expressed in mesenchymal cells. We observed an increase in the level of vimentin mRNA (6-fold increase, Figure 6B, left) and protein (2-fold increase, Figure 6B, right) in the livers of the TCDD-treated animals as compared to the untreated ones.

Taken together, these data clearly demonstrate that dioxin up-regulates *in vivo* the expression of mesenchymal markers and down-regulates epithelial markers.

TCDD stimulates *Snai2* expression through activation of the AhR in both mouse liver & human hepatic cells.

In order to gain mechanistic insight into the effect of dioxin on the fibrosis gene expression profile, we carried out *in vitro* studies. Since we previously showed that treatment of the human hepatocarcinoma cell line, HepG2, with TCDD leads to a decrease of E-Cadherin expression, we investigated whether members of the Snail family, were also regulated in this cell line. We showed that, in this cell line, the expression of *hSnai2* is up-regulated by TCDD, in agreement with the observations of Ikuta *et al* in the human keratinocyte cell line HaCAT (45). A dose-response analysis showed that, 48h following treatment, both *hSnai2* mRNA and protein increased as a function of the TCDD concentration and that this increase was maximal at 100 nM (Figure 7A). Following treatment of cells with 25 nM TCDD, the levels of both *hSnai2* mRNA and protein increased as a function of time (Figure 7B). We carried out ChIP experiments in the *hSnai2* promoter region, which contains putative XREs, in order to prove that *hSnai2* was a direct transcriptional target of the AhR. AhR binding significantly increased 15 and 45 minutes after treatment with TCDD (Figure 7C). This suggests that the AhR is directly involved in the regulation of *hSnai2* in the HepG2 *in vitro* model.

Taken together, these results demonstrate that, following activation by its ligand (TCDD), the AhR up-regulates the expression of *Snai2* both in the HepG2 *in vitro* model and in a mouse *in vivo* model.

Discussion

Environmental pollutants have been implicated in liver carcinogenesis, liver toxicity, liver steatosis and in the alteration of liver functions including metabolic pathways (46). Little is known about their effects on liver fibrosis despite the public health relevance of this condition. In fact, it is assumed that chemically-elicited chronic liver toxicity will eventually lead to fibrosis. An alternative possibility is that chemicals could directly activate the biological pathways that orient liver cells towards the fibrotic state. The present studies attempt to address these issues.

In the mouse liver, dioxin up-regulates the expression of the fibrosis markers Coll1 α 1, α -SMA, and of the inflammatory markers IL-1 β , TNF α and MCP1 which, eventually, is accompanied by a dramatic liver fibrotic phenotype observed 5 weeks after weekly treatments. These data clearly suggest that sustained exposure to TCDD leads to the development of hepatic fibrosis in mice and that this is probably mediated by the AhR since this receptor is the only known target of dioxin. In fact, similar studies carried in AhR $^{-/-}$ mice showed no effect of TCDD (data not shown). We suspect that other AhR ligands could lead to similar effects. Since cigarette smoke contains several AhR ligands, the mechanism we have uncovered here could account at least partially for the well-established liver effect of cigarette smoke.

Several studies have demonstrated the predominant role of stellate cells in fibrosis progression (47-49). In the present study, we show that inflammatory markers were activated by TCDD and that FSP1, a marker of fibroblasts was also up-regulated. However, more recent investigations have suggested that adult hepatocytes might also be involved in the establishment of fibroblasts in the liver (3, 5). *In vitro* studies have clearly demonstrated that cultured primary hepatocytes or hepatocyte cell lines treated with inducers of EMT (such as TGF β) display significant reversion of their epithelial phenotype toward acquired characteristics of mesenchymal cells (9). However, it is still a matter of controversy as to whether the EMT is involved in the progression to fibrosis in the liver (*in vivo*). Using lineage-tracing experiments, Zeisberg et al suggested that, upon treatment with CCl₄, which is routinely used to induce fibrosis in rodents, a significant number of fibroblasts might be derived from hepatocytes in advanced stages of fibrosis. Indeed, the staining of these cells was positive for both types of markers (albumin indicative of hepatocytes and FSP1 indicative of fibroblasts) suggesting an incomplete conversion (5), but these data have been recently challenged (10). Nevertheless, a very recent report demonstrates that *mSnai1* expression (which is shown to be induced by dioxin in the presented study) was specifically increased in hepatocytes in response to acute liver challenging and,

interestingly, that specific hepatocyte ablation of *mSnai1* disrupted fibrotic progression (4). In addition, the expression of *mSnai1* triggered growth factor expression, inflammatory processes and biosynthesis of the extracellular matrix related to liver fibrosis (4). Recent work from several laboratories including our own, have also shown that TCDD regulates several genes involved in cell motility and in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) (16-19). We have shown, in particular, that the expression of E-cadherin is repressed. Although JNK activation and NEDD9 induction were shown to be involved, the actual molecular mechanism of E-cadherin repression by TCDD has not been elucidated completely. Since the Snail family of transcription factors is known to be involved in E-cadherin repression, and, since it is also involved in the development of liver fibrosis (4), we have focused, in the present study, on the regulation of this family of proteins. We show by *in vitro* experiments, using the HepG2 cell line, that Snai2 is induced by TCDD (in agreement with observations made in keratinocytes, (45)), and that the binding of the AhR to the promoter of the *hSnai2* gene increases following treatment with TCDD. We also show that dioxin up-regulates *mSnai1* and *mSnai2* (two members of the Snail family), several mesenchymal markers (including MMPs 2 and 9, Fibronectin and Vimentin) and down-regulates two epithelial markers (Claudin1 & E-cadherin). Importantly, Snai2 is induced by TCDD *in vivo* as early as 48 h of treatment, in line with the *in vitro* data. This suggests that Snai2 induction is an early event.

Our data highlight the role of Snai2 induction in the effect of TCDD on liver fibrosis. A simple model that would account for our observations is that TCDD induces Snai2 through the AhR and that the induction of Snai2 eventually leads to fibrosis. It is likely that Snai2 induces at least some steps of EMT. However we have also observed inflammation and this could be triggered by a different mechanism. In addition, we cannot eliminate the possibility that liver toxicity elicited by TCDD could also contribute to fibrosis. What our studies indicate is that at least part of the mechanism of TCDD action is through the direct induction of critical fibrosis-promoting genes.

This report describes the effects of an AhR ligand on fibrosis *in vivo* and to point to a role for activated AhR in this liver pathology. Interestingly, the AhR KO mice display several developmental abnormalities, including a decrease in the liver size (50, 51) and a TGF β signaling-dependent fibrosis (52). Although these observations may seem paradoxical at first sight, they do, in fact, support the hypothesis that TCDD and possibly other related xenobiotic ligands, exert their effects, at least partially, by disrupting the endogenous functions of the receptor. Interestingly, the phenotypes of AhR KO models and TCDD-treated cells or tissues display other similarities such as cell cycle regulation (53). One interpretation of these observations is that

endogenous or alternative ligands of the AhR may display anti-fibrotic effects. In this regard, it is noteworthy that other studies have shown that this receptor can bind ligands which antagonize the action of TCDD and which trigger their own specific effects (54). However, it is also possible that the mechanisms of liver dysfunction and fibrosis in the absence of the AhR and in the presence of stable AhR ligands may be diverse. This possibility needs further exploration. In all cases, in addition to the conclusion that environmental pollutants can act as liver profibrotic agents, this study also points to the AhR as a possible drug target for liver disease prevention.

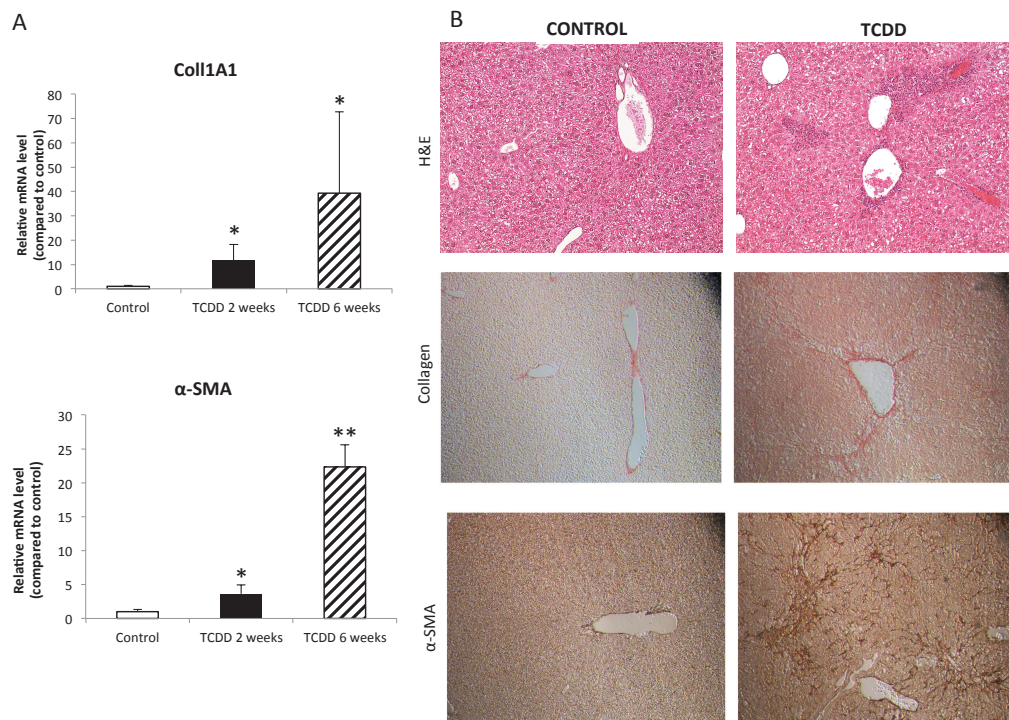


Figure 1: TCDD increases the hepatic fibrosis markers Coll1a1 and alpha-SMA. **A.** Wild-type mice were treated two times at day 0 and 7 (2 weeks) or 6 times at day 0, 7, 14, 21, 28, and day 35 (6 weeks) with either TCDD (25µg/kg) or corn oil (NT) and respectively sacrificed at day 14 or day 42. Collagen1α1 and alpha-smooth muscle actin mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. *, $p < 0.05$ or **, $p < 0.01$ as compared to controls. **B** Wild-type mice were treated two times at day 0 and 7 with either TCDD (25µg/kg) or corn oil (NT) and sacrificed at day 14. Hematoxylin/eosin staining of liver tissues, collagen and alpha-smooth muscle actin. Scale bar = 100 µm.

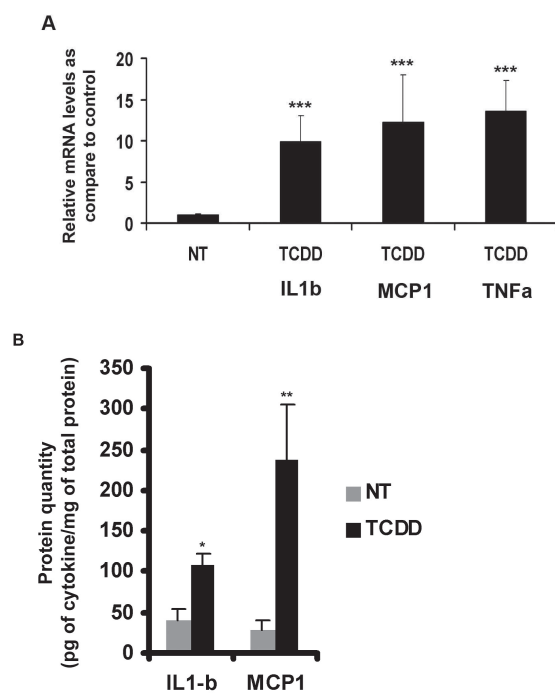


Figure 2: TCDD increases the hepatic pro-inflammatory cytokines, IL1 β , MCP1 and TNF α . Wild-type mice were treated two times at day 0 and 7 with either TCDD (25 μ g/kg) or corn oil (NT) and sacrificed at day 14. IL1 β , MCP1 and TNF α mRNA levels (**A**) were measured by qRT-PCR. (**B**) The amounts of IL-1 β and MCP1 protein were estimated using an ELISA assay. Proteins are expressed as pg of cytokine per mg of total protein. mRNA results were normalized compared to NT condition. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$ and *, $p < 0.05$ compared to controls ($n = 4$).

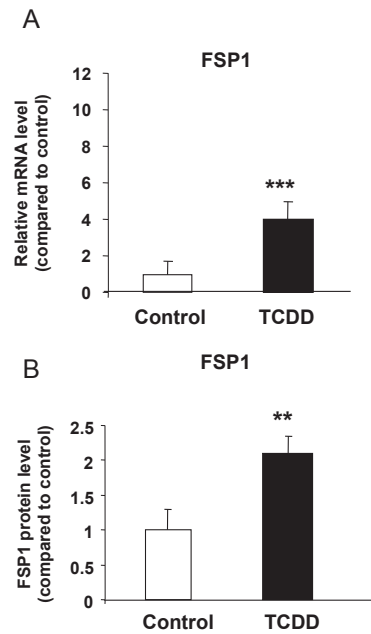


Figure 3: TCDD increases the hepatic marker of activated fibroblasts, FSP1. Wild-type mice were treated two times at day 0 and 7 with either TCDD (25µg/kg) or corn oil (NT) and sacrificed at day 14. FSP1 mRNA levels **(A)** and FSP1 protein levels **(B)** were analyzed by qRT-PCR and western blot respectively. Actin was used as a loading control for western blots and quantification was performed using Image J software. ***, $p < 0.001$; **, and $p < 0.01$ compared to controls ($n = 4$).

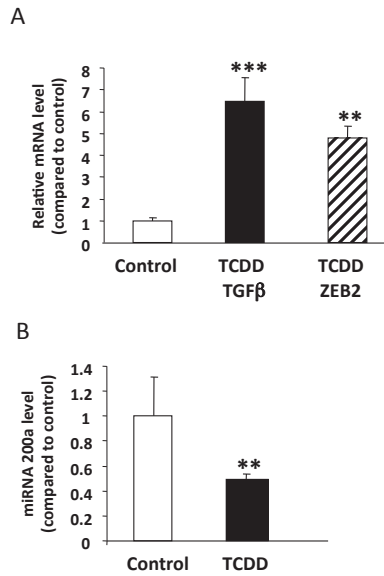


Figure 4: TCDD regulates the expression of the hepatic fibrosis inducer, TGFβ, and of its gene targets. Wild-type mice were treated two times at day 0 and 7 with either TCDD (25μg/kg) or corn oil (NT) and sacrificed at day 14. **(A)** TGFβ and ZEB2 mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. **(B)** miRNA 200a was analyzed by specific qRT-PCR. mRNA or miRNA results were normalized compared to control condition. ***, $p < 0.001$ and **, $p < 0.01$ compared to controls ($n = 4$).

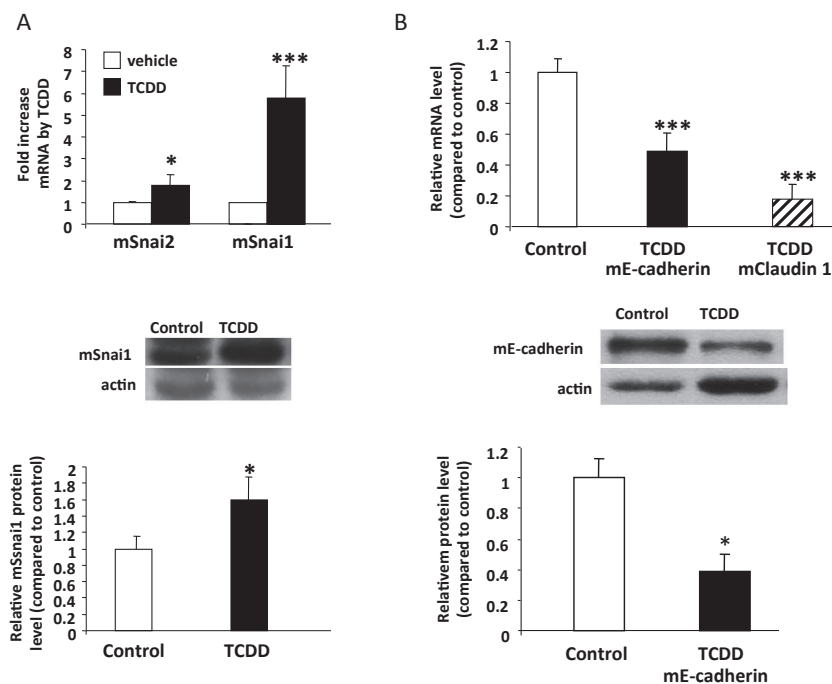


Figure 5: TCDD regulates the expression of mSnai1, mSnai2, mE-cadherin and mClaudin 1 in mouse liver.

Male wild-type mice were treated twice at day 0 and 7 with either TCDD (25µg/kg) or corn oil (control) and sacrificed at day 14. The *mSnai1* and *mSnai2* mRNA (**A**) and the *mE-cadherin* and *claudin1* mRNA (**B**) levels were measured by qRT-PCR (left panel). mRNA results were normalized compared to control condition. The mSnai1 protein (**A**) and E-cadherin protein (**B**) amounts were analyzed by western blot and quantified (right panel). Intensities were normalized by comparison to the actin signal, using Image J software. ***, $p < 0.001$ and *, $p < 0.05$ compared to controls ($n > 3$).

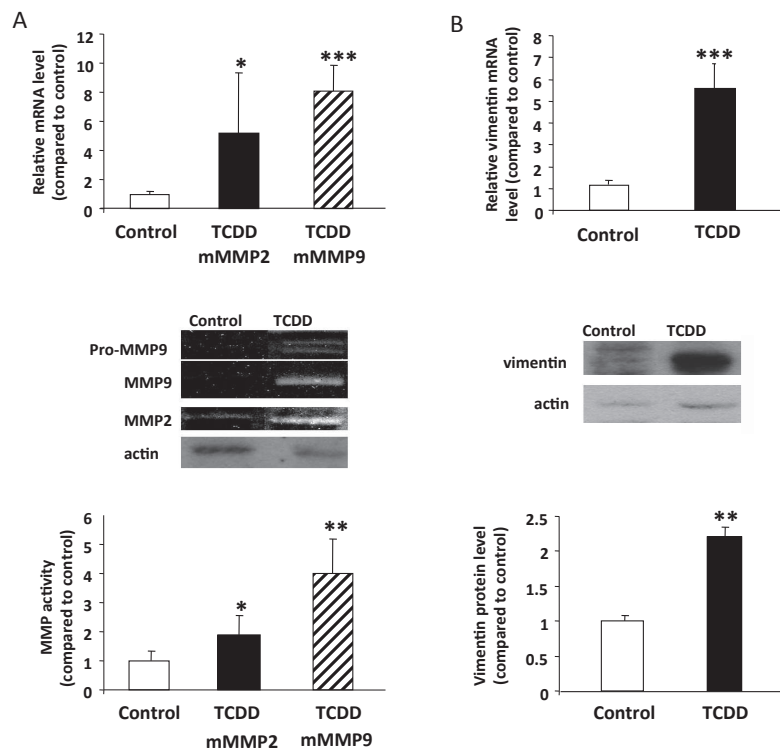


Figure 6: TCDD increases mesenchymal markers (MMP2, MMP9 and vimentin) in mouse liver. Wild-type mice were treated twice at day 0 and 7 with either TCDD (25µg/kg) or corn oil (NT) and sacrificed at day 14. mRNA levels of MMP2, MMP9 (**A**) and vimentin (**B**) were measured by qRT-PCR (left panel). The proteolytic activity of pro-MMP, MMP2 and MMP9 (**A**) was assessed by gelatin (right panel), with actin used as a loading control. Vimentin protein levels (**B**, right panel) were analyzed by western blot and quantified (intensities were normalized by comparison to the actin signal). All quantifications were done using Image J software. mRNA results were normalized compared to NT condition. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$ and *, $p < 0.05$ compared to controls ($n = 4$).

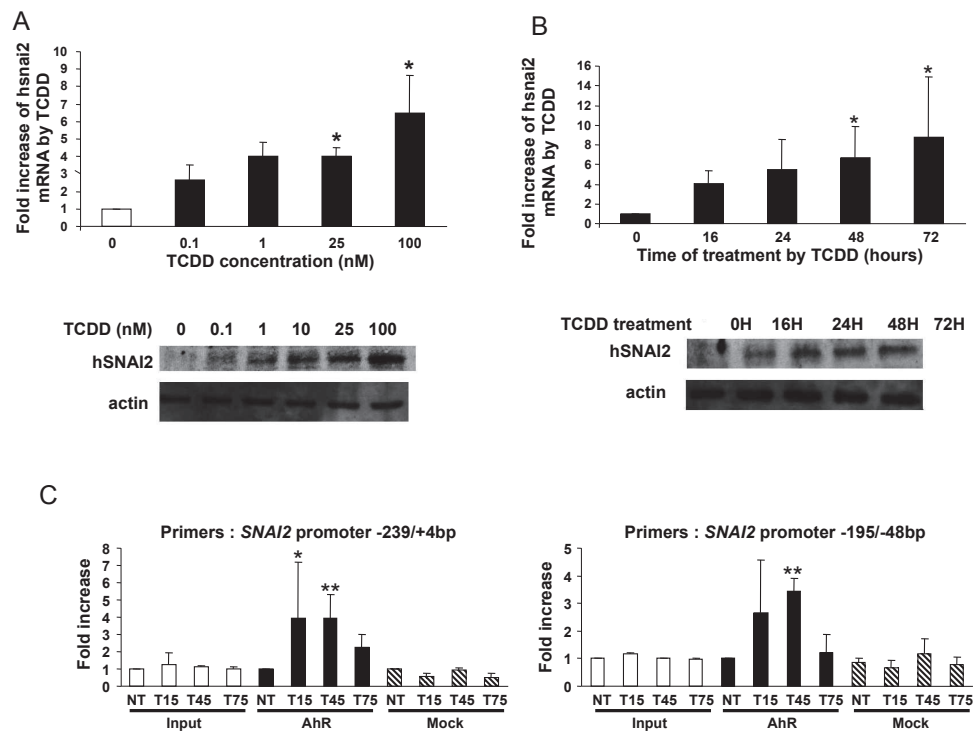


Figure 7: TCDD increases *mSnai2* expression in the mouse liver and in the human HepG2 cell line through the AhR pathway. **A.** HepG2 cells were treated or not with increasing concentrations of TCDD (0-100 nM) for 48h. The amounts of *hSnai2* mRNA and protein were analyzed by qRT-PCR (left panel) and western-blot (right panel), respectively. **B.** HepG2 cells were treated with 25 nM TCDD or not for times between 16 and 72h. The amounts of mRNA and protein were measured as in A. **C.** Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed on the *hSnai2* promoter region. HepG2 cells were treated, or not, with 25 nM TCDD for 15, 45 or 75 min. Gene specific qPCR analysis with two different couples of primers spanning the AhR binding region of the *hSnai2* gene promoter was performed using genomic DNA immunoprecipitated with either an AhR or a mock IgG antibody and an equal amount of input DNA as described in the methods. The non-treated (NT) sample was used as a control for each condition. *, $p < 0.05$ or **, $p < 0.01$ as compared to controls.

mRNA	Fold induction (2w)	Fold induction (6w)
AhR	-	1,6
CYP1a1	-	55372,14*
Collagene 1A1	11,7*	39,31*
alpha-SMA	3,6*	22,34**
IL-1 β	9,8***	14,07**
MCP1	12,1***	61,82**
TNF-alpha	13,4***	20,13**
CCR5	-	3,96*
FSP1	4,2***	5,32*
TGF β	6,1***	6,49*
Zeb2	4,3**	4,34*
RasGPR1	-	3,98*

Table 1: relative mRNA expression of fibrosis and inflammatory markers in pre-fibrotic and fibrotic livers of mice subchronically treated with TCDD. Wild-type mice were treated two times at day 0 and 7 with either TCDD (25 μ g/kg) or corn oil (NT) and sacrificed at day 14 (second column) or five times at day 0 – 7 – 14 – 21 – 28 with either TCDD (25 μ g/kg) or corn oil (NT) and sacrificed at day 35 (third column). Ahr battery genes, fibrosis and inflammatory markers (first column) expression were assessed by qRT-PCR. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$ and *, $p < 0.05$ compared to controls.

Bibliography

1. Brenner DA, Waterboer T, Choi SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchardt E, Yamauchi M, et al. New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000;32:32-38.
2. Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:605-628.
3. Ikegami T, Zhang Y, Matsuzaki Y. Liver fibrosis: possible involvement of EMT. *Cells Tissues Organs* 2007;185:213-221.
4. Rowe RG, Lin Y, Shimizu-Hirota R, Hanada S, Neilson EG, Greenson JK, Weiss SJ. Hepatocyte-derived Snail1 propagates liver fibrosis progression. *Mol Cell Biol* 2011;31:2392-2403.
5. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007;282:23337-23347.
6. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003;83:655-663.
7. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125:437-443.
8. Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001;34:248-253.
9. Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology* 2009;50:2007-2013.
10. Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Penz-Osterreicher M, Brenner DA. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2010;51:1027-1036.
11. Altamirano J, Bataller R. Cigarette smoking and chronic liver diseases. *Gut* 2010;59:1159-1162.
12. Mallat A, Lotersztajn S. Cigarette smoke exposure: a novel cofactor of NAFLD progression? *J Hepatol* 2009;51:430-432.
13. Pessione F, Ramond MJ, Njapoum C, Duchatelle V, Degott C, Erlinger S, Rueff B, et al. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;34:121-125.
14. Zein CO. Clearing the smoke in chronic liver diseases. *Hepatology* 2010;51:1487-1490.

15. Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett* 2007;581:3608-3615.
16. Bui LC, Tomkiewicz C, Chevallier A, Pierre S, Bats AS, Mota S, Raingeaud J, et al. Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity. *Oncogene* 2009.
17. Carvajal-Gonzalez JM, Mulero-Navarro S, Roman AC, Sauzeau V, Merino JM, Bustelo XR, Fernandez-Salguero PM. The dioxin receptor regulates the constitutive expression of the vav3 proto-oncogene and modulates cell shape and adhesion. *Mol Biol Cell* 2009;20:1715-1727.
18. Carvajal-Gonzalez JM, Roman AC, Cerezo-Guisado MI, Rico-Leo EM, Martin-Partido G, Fernandez-Salguero PM. Loss of dioxin-receptor expression accelerates wound healing in vivo by a mechanism involving TGFbeta. *J Cell Sci* 2009;122:1823-1833.
19. Diry M, Tomkiewicz C, Koehle C, Coumoul X, Bock KW, Barouki R, Transy C. Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene* 2006.
20. Tomkiewicz C, Herry L, Bui LC, Metayer C, Bourdeloux M, Barouki R, Coumoul X. The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene* 2012.
21. Connor KT, Aylward LL. Human response to dioxin: aryl hydrocarbon receptor (AhR) molecular structure, function, and dose-response data for enzyme induction indicate an impaired human AhR. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2006;9:147-171.
22. Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock JP, Jr. Use of cDNA microarrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression. *Toxicol Lett* 2001;122:189-203.
23. Puga A, Maier A, Medvedovic M. The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1129-1142.
24. Denison MS, Soshilov AA, He G, DeGroot DE, Zhao B. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci* 2011;124:1-22.
25. Davarinos NA, Pollenz RS. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem* 1999;274:28708-28715.

26. Enan E, Matsumura F. Regulation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) of the DNA binding activity of transcriptional factors via nuclear protein phosphorylation in guinea pig adipose tissue. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1199-1206.
27. Henry EC, Kent TA, Gasiewicz TA. DNA binding and transcriptional enhancement by purified TCDD.Ah receptor complex. *Arch Biochem Biophys* 1997;339:305-314.
28. Ma Q. Aryl hydrocarbon receptor degradation-promoting factor (ADPF) and the control of the xenobiotic response. *Mol Interv* 2007;7:133-137.
29. Mandal PK. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol B* 2005;175:221-230.
30. Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 2003;1619:263-268.
31. Okey AB. An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: the Deichmann Lecture, International Congress of Toxicology-XI. *Toxicol Sci* 2007;98:5-38.
32. Wilson CL, Safe S. Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. *Toxicol Pathol* 1998;26:657-671.
33. Marinkovic N, Pasalic D, Ferencak G, Grskovic B, Stavljenic Rukavina A. Dioxins and human toxicity. *Arh Hig Rada Toksikol* 2010;61:445-453.
34. Akiri G, Sabo E, Dafni H, Vadasz Z, Kartvelishvily Y, Gan N, Kessler O, et al. Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res* 2003;63:1657-1666.
35. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-867.
36. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 2005;92:1955-1958.
37. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1640-1646.
38. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. Evolutionary history of the Snail/Scratch superfamily. *Trends Genet* 2009;25:248-252.
39. De Craene B, van Roy F, Berx G. Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal* 2005;17:535-547.

40. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76-83.
41. Koval M. Claudins--key pieces in the tight junction puzzle. *Cell Commun Adhes* 2006;13:127-138.
42. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:155-166.
43. Chen P, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *J Cell Biochem* 2009;108:1233-1243.
44. Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs* 2007;185:191-203.
45. Ikuta T, Kawajiri K. Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *Exp Cell Res* 2006;312:3585-3594.
46. Lee JH, Wada T, Febbraio M, He J, Matsubara T, Lee MJ, Gonzalez FJ, et al. A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology* 2010;139:653-663.
47. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1383-1394.
48. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250.
49. Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999;117:1205-1221.
50. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 1995;268:722-726.
51. Fernandez-Salguero PM, Ward JM, Sundberg JP, Gonzalez FJ. Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol* 1997;34:605-614.

52. Zaher H, Fernandez-Salguero PM, Letterio J, Sheikh MS, Fornace AJ, Jr., Roberts AB, Gonzalez FJ. The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Mol Pharmacol* 1998;54:313-321.
53. Chang X, Fan Y, Karyala S, Schwemberger S, Tomlinson CR, Sartor MA, Puga A. Ligand-independent regulation of transforming growth factor beta1 expression and cell cycle progression by the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biol* 2007;27:6127-6139.
54. Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 2004;24:5209-5222.

D. Conclusion

Cette étude démontre que la TCDD, polluant organique persistant, régule l'expression de marqueurs pro-fibrotiques tels que le collagène de type I, et l' α -SMA ainsi que celle de gènes pro-inflammatoires. Les modifications d'expression génique sont aussi accompagnées d'une altération de la structure hépatique pour le traitement le plus long (6 semaines). Ces résultats suggèrent que la TCDD est impliquée dans des mécanismes pro-fibrotiques. De plus, la fibrose hépatique est également observée chez les souris AhR^{-/-} comme je l'ai déjà évoqué. Ces résultats supportent l'hypothèse que la TCDD est un perturbateur des fonctions endogènes du AhR (voir chapitre V).

Les mécanismes cellulaires survenant lors des fibroses sont multiples. Un des mécanismes impliqués est la transition épithélio-mesenchymateuse de type 2³⁰. Nous avons montré, dans cette étude, une augmentation de Snai1, facteur de transcription impliqué dans les processus de TEM ainsi que d'une de ces cibles, Zeb2 (« zinc finger E-box binding homeobox 2 »). Une étude récente montre que Snai1 joue un rôle essentiel dans l'induction de la fibrose hépatique (Rowe et al., 2011). Ce groupe de recherche a généré des souris transgéniques où Snai1 est spécifiquement absent des hépatocytes. Le traitement de ces souris avec un agent pro-fibrotique (CCl₄ : tétrachlorure de carbone) entraîne un moindre dépôt de collagène de type I et réduit significativement la progression de la fibrose par rapport aux souris sauvages. Ces résultats suggèrent donc que la TCDD, en régulant l'expression de gènes impliqués dans la TEM, favorise l'apparition d'une fibrose.

Dans leur globalité, ces observations soulèvent la question de la contribution des polluants environnementaux présents en faibles concentrations dans notre environnement dans la survenue de maladies chroniques hépatiques. Elles ont conduit le laboratoire à développer des projets d'étude de l'influence de mélanges pertinents (mélange de polluants et alcool) ou de contexte particulier (obésité, polluants) dans la survenue de ces pathologies.

³⁰ Il existe trois types de TEM : la TEM de type 1 est associée avec l'implantation fœtale, la formation embryonnaire et le développement des organes. La TEM de type 2 est associée à la guérison de blessure, la régénération des tissus et la fibrose d'organes. Enfin, la TEM de type 3 est observée dans les cellules épithéliales cancéreuses qui peuvent alors envahir un organe *via* la circulation, générant ainsi les effets systémiques de la progression tumorale maligne par le développement de métastases.

Articles annexes 2 :

Titre 1 : Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity

Auteurs: L-C Bui, C Tomkiewicz, A Chevallier, S Pierre, A-S Bats, S Mota, J Raingeaud, J Pierre, M Diry, C Transy, M Garlatti, R Barouki and X Coumoul

Article publié dans Oncogene

Titre 2 : Induction of the Ras activator Son of Sevenless 1 by environmental pollutants mediates their effects on cellular proliferation

Auteurs: Stéphane Pierre, Anne-Sophie Bats, Aline Chevallier, Linh-Chi Bui, Ariane Ambolet-Camoit, Michèle Garlatti, Martine Aggerbeck, Robert Barouki, Xavier Coumoul

Article publié dans Biochemical Pharmacology

IX. Implication du AhR dans les processus de migration et de prolifération cellulaire

Articles publiés dans *Oncogene* (Bui et al., 2009) et dans *Biochemical Pharmacology* (Pierre et al., 2011).

La TCDD est un polluant environnemental classé parmi les molécules « cancérigènes chez l'Homme mais non mutagènes » par l'IARC (« International Agency for Research on Cancer ») et comme substance cancérigène par l'OMS. Une étude transcriptomique menée auparavant, au laboratoire, a permis de mettre en évidence de nouvelles cibles de la dioxine dont des gènes impliqués dans la plasticité cellulaire et la migration.

- i) Le premier article annexe concerne la régulation du gène *Nedd9/Hef1/Cas-L* par la dioxine. *Hef1* code une protéine multifonctionnelle faisant partie de la voie de signalisation des intégrines, qui est impliquée dans la régulation de différents processus cellulaires dont l'apoptose, la croissance cellulaire, la motilité et la transformation oncogénique. Cette étude a été réalisée dans le modèle d'hépatocarcinome humain, HepG2. Nous avons montré que la dioxine augmente l'expression de *Hef1* (ARNm et protéine) par un mécanisme transcriptionnel dépendant du AhR. Des expériences d'ARN interférence démontrent par ailleurs son rôle majeur dans les modifications phénotypiques cellulaires observées en présence de TCDD.
- ii) Le deuxième article porte sur l'étude de la régulation par la dioxine de la protéine *SOS1* (« Son Of Sevenless 1 ») qui est un facteur d'échange de GTP/GDP. *SOS1* permet l'activation des petites protéines G telles que Ras et Rac. L'activation de la protéine Ras stimule la prolifération cellulaire alors que la protéine Rac participe aux processus de plasticité cellulaire. Nous avons montré que l'expression de la protéine *SOS1* est augmentée par la dioxine, mécanisme transcriptionnel dépendant du AhR et que cette augmentation favorise la croissance cellulaire.

ORIGINAL ARTICLE

Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity

L-C Bui^{1,2,6}, C Tomkiewicz^{1,2,6}, A Chevallier^{1,2}, S Pierre^{1,2}, A-S Bats^{1,2}, S Mota^{1,2}, J Raingeaud³, J Pierre³, M Diry^{2,4}, C Transy^{2,4,7}, M Garlatti^{1,2}, R Barouki^{1,2,5} and X Coumoul^{1,2}

¹INSERM UMR-S 747, Paris, France; ²Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris, France; ³INSERM U461, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, France; ⁴INSERM U490, Paris, France and ⁵APHP, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France

Aryl hydrocarbon receptor (AhR), or dioxin receptor, is a transcription factor that induces adaptive metabolic pathways in response to environmental pollutants. Recently, other pathways were found to be altered by AhR and its ligands. Indeed, developmental defects elicited by AhR ligands suggest that additional cellular functions may be targeted by this receptor, including cell migration and plasticity. Here, we show that dioxin-mediated activation of AhR induces Nedd9/Hef1/Cas-L, a member of the Cas protein family recently identified as a metastasis marker. The *Hef1* gene induction is mediated by two xenobiotic responsive elements present in this gene promoter. Moreover, using RNA interference, we show that Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the dioxin-elicited changes related to cell plasticity, including alterations of cellular adhesion and shape, cytoskeleton reorganization, and increased cell migration. Furthermore, we show that both E-cadherin repression and Jun N-terminal kinases activation by dioxin and AhR also depend on the expression of Nedd9/Hef1/Cas-L. Our study unveils, for the first time, a link between pollutants exposure and the induced expression of a metastasis marker and shows that cellular migration and plasticity markers are regulated by AhR and its toxic ligands.

Oncogene (2009) 28, 3642–3651; doi:10.1038/onc.2009.224; published online 3 August 2009

Keywords: PAHs; cellular plasticity; toxicology; xenobiotics; metastasis marker

Introduction

Environmental pollutants such as dioxins, PCBs and polyaromatic hydrocarbons exert a variety of long-term toxic effects in animals and humans, including altera-

tions in fetal development, immunotoxicity and cancer. The actual mechanisms of these effects remain elusive. A large number of these pollutants are potent ligands and activators of aryl hydrocarbon receptor (AhR), which is required for their toxic effects as revealed by AhR knockout mice. One of the main functions of this receptor is the well-described adaptive regulation of xenobiotic metabolism (Kohle and Bock, 2007). Indeed, on ligand binding, AhR forms a transcription factor with its partner ARNT and induces a number of xenobiotic metabolizing enzymes, such as those of the cytochromes P450 1 family (CYP1). However, this function accounts for only part of the toxicity of AhR ligands, as shown by targeted knockouts of some of the *CYP* genes. Thus, alternative mechanisms have been investigated (Mulero-Navarro *et al.*, 2005; Diry *et al.*, 2006). The activation of this receptor has been shown to elicit diverse cellular alterations, including modifications of cell cycle regulation, cell migration and contact inhibition (Mulero-Navarro *et al.*, 2005; Puga *et al.*, 2005; Diry *et al.*, 2006). These alterations could possibly mediate part of the long-term toxicities of the AhR ligands in animals and humans; chronic exposure to several AhR ligands, which are common and persistent pollutants, is frequent in industrialized populations (tobacco smoke, air pollution, food contamination). However, the primary target gene(s) that could mediate such effects remain elusive.

Few studies have addressed the possibility that environmental pollutants could target cellular plasticity, a set of phenotypic changes in cell adhesion, cytoskeleton reorganization and migratory behavior correlated with modulation of gene expression. We have investigated the possible implication of AhR in those events as any dysregulation of these cellular pathways may disrupt normal fetal development and favor cancer progression in addition to a variety of other toxic effects. We have particularly focused on regulatory proteins that control cellular migration; indeed, preliminary large-scale studies indicated that the *Nedd9/Hef1/Cas-L* gene (named *Hef1* in the rest of the article) might be modulated by dioxin in human cultured cells (Frueh *et al.*, 2001; Diry *et al.*, 2006).

Hef1 has been identified as a filamentation inducer in a human cDNA screen in *Saccharomyces cerevisiae* (Law

Correspondence: Dr R Barouki or Dr X Coumoul, UMR-S 747 Toxicologie, Pharmacologie et Signalisation Cellulaire, Université Paris Descartes/INSERM, Faculté de Médecine des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, Paris, Ile de France, 75006, France.

E-mails: robert.barouki@univ-paris5.fr or

xavier.coumoul@parisdescartes.fr

⁶These authors contributed equally to this work.

⁷Current address: Institut Cochin, Inserm, U567, 27 rue du faubourg St Jacques, 75014, Paris, France

Received 1 December 2008; revised 21 June 2009; accepted 28 June 2009; published online 3 August 2009

et al., 1996). As a scaffold protein, it mediates integrin signaling, relaying transduction signals notably toward Jun N-terminal kinases (JNKs) and apoptosis pathways (Law *et al.*, 2000). Recently, Hef1 has been linked to the regulation of the mitotic spindle and primary cilium formation (Pugacheva and Golemis, 2005; Pugacheva *et al.*, 2007); interestingly, screening for metastasis markers in cancer samples has identified Hef1 as a frequent tag in melanoma progressing tumors (Kim *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2007). Considering the lack of studies on the potential implications of environmental pollutants in cancer progression and in the regulation of cellular plasticity, we believed that a link between the AhR and Hef1 expression would be of primary importance. The aim of this study was to decipher the induction mechanism of Hef1 by dioxin and its receptor in the HepG2 cells and then to unravel the contribution

of this new AhR target to the cellular events elicited by environmental pollutants.

Results

HepG2 cells were routinely treated with 25 nM dioxin, which is in line with the concentration range used to treat human cells (5–100 nM). Figure 1 (and see Supplementary information SF1) shows several independent fields of control and dioxin-treated HepG2 cells; dioxin (TCDD, tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) elicits a time-dependent cells desegregation, which starts at 24 h of treatment and which is clearly observed after 48 h. The treated cells adopt a crescent-like shape and have lost the contacts present in control cells

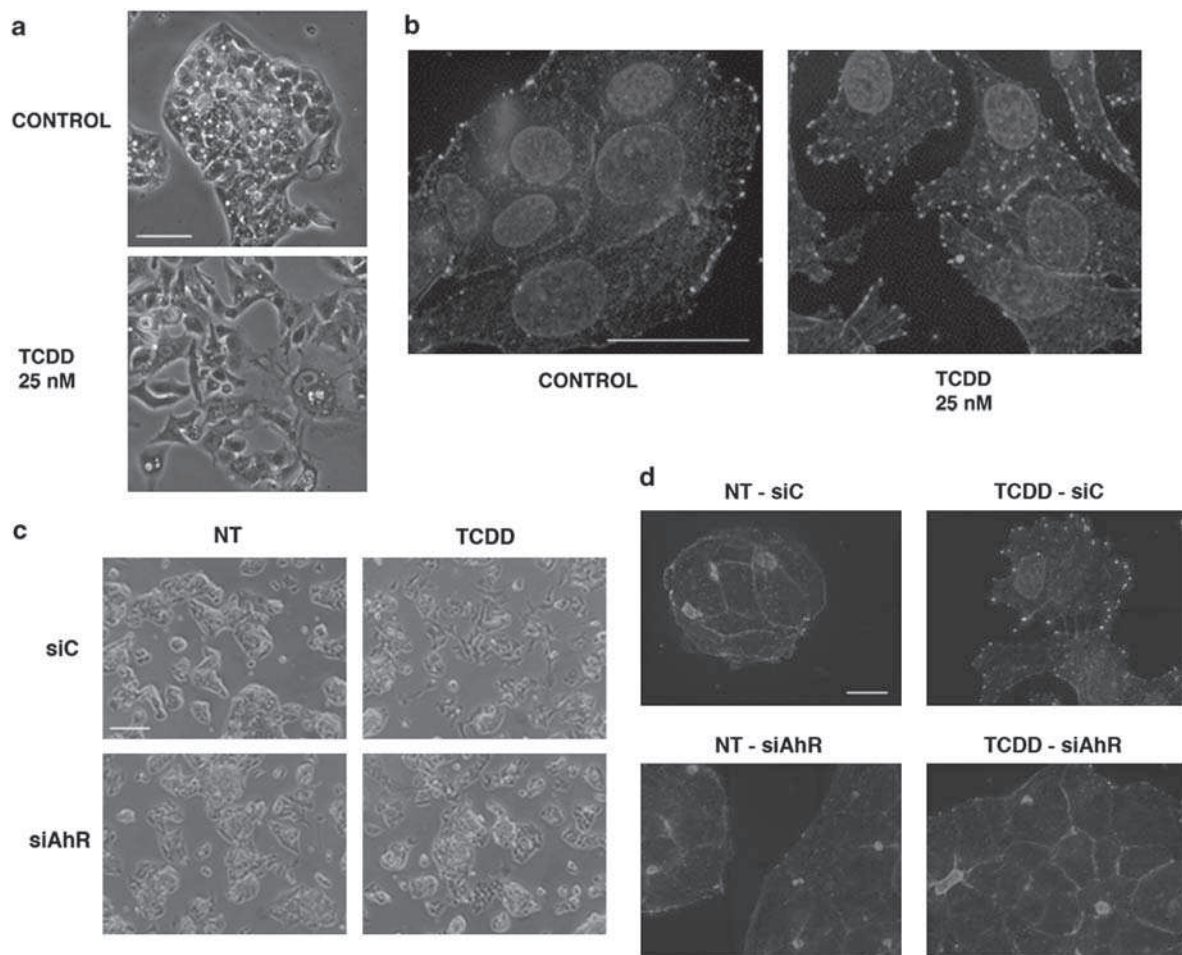


Figure 1 Dioxin treatment of HepG2 cells dramatically changes cell shape and focal adhesion sites number through an aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependant mechanism. (a) Phase contrast microscopy of HepG2 cells treated or not with dioxin (25 nM). Characterized HepG2 clusters are disorganized in the presence of dioxin and cells adopt a crescent-like structure. Scale bar, 10 μ m. (b) Fluorescence microscopy of HepG2 cells treated or not with dioxin (25 nM). After 48 h treatment, HepG2 were fixed and immunostained with a vinculin antibody, TRITC-phalloidin and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Dioxin increases the number of focal adhesion sites characterized by vinculin staining and lamellipodia formation. Scale bar, 10 μ m. (c) Phase contrast microscopy of small interfering RNA (siRNA)-transfected HepG2 cells treated or not with dioxin (25 nM). Control siRNA (siC) and AhR siRNA (siAhR) were used to assess the role of AhR. siAhR transfection significantly reduces the number of crescent-shaped cells observed on dioxin treatment. Scale bar, 20 μ m. (d) Fluorescence microscopy of siRNA-transfected HepG2 cells treated or not with dioxin (25 nM). siAhR transfection significantly reduces the number of focal adhesion sites and lamellipodia observed on dioxin treatment. Scale bar, 10 μ m. A full colour version of this figure is available at the *Oncogene* journal online.

(Figure 1a). A dose-response experiment confirms that the modification of cell shape by dioxin starts at 1 nM, is clear at 10 nM and maximal at 25 nM, which is consistent with the known affinity of AhR for this pollutant in humans (data not shown). We next examined the cytoskeleton reorganization by using immunofluorescent actin and vinculin staining to confirm those preliminary observations. Vinculin is known to interact with integrins, to modulate focal adhesion structure and functions, and to have key roles in cell shape control; it is critical for the control of cell spreading and lamellipodia formation (Ziegler *et al.*, 2006). A dramatic increase of the vinculin-containing focal adhesion sites number and lamellipodia was observed in dioxin-treated cells together with cell shape changes (Figure 1b). As dioxin exerts most, if not all, of its effects through AhR activation, we assessed the contribution of this receptor by carrying AhR small interfering RNA (siRNA) knockdown experiments in HepG2 cells (Figures 1c and d). Although dioxin still modified cell shape and cytoskeleton organization in control siRNA-transfected cells, knockdown of AhR (see siRNA effects on Figure 2d, and see Supplementary information SF2) dramatically reduced the number of crescent-shaped cells (Figure 1c) and focal adhesion sites number (Figure 1d) on dioxin treatment. This confirms that dioxin and its receptor trigger cellular plasticity and alter cellular morphology in HepG2 cells.

To identify putative AhR targets involved in these cellular events, we screened several microarray data (from our laboratory and from other groups) to monitor gene expression changes on dioxin treatment of HepG2 cells (Ma and Whitlock, 1996; Frueh *et al.*, 2001; Marchand *et al.*, 2005) and noted that the Nedd9/Hef1/Cas-L appeared to be a putative target. As recent data indicated that this gene could be involved in cellular plasticity and tumor metastasis, it was important to first confirm and characterize the modulation of Hef1 by dioxin and by AhR in HepG2 cells. Figure 2 shows that dioxin significantly increases Hef1 mRNA and protein expression (Figures 2a and b) in a dose-dependent and time-dependent manner. Maximal increase was achieved at 24-h treatment time and at 10 nM (Figures 2a and b). This confirms that dioxin induces Hef1 expression in HepG2 cells. To assess the tissue specificity of Hef1 induction by dioxin in an *in vivo* context, we measured Hef1 mRNA levels in several mice tissues on TCDD treatment; we found that Hef1 mRNA is significantly induced in the skin, heart, skeletal muscle and liver on TCDD exposure (data not shown).

Our next goal was to decipher the mechanism of dioxin-dependant Hef1 induction. We used 5,6-dichloro-beta-D ribofuranosyl benzimidazole to block mRNA synthesis and assess Hef1 mRNA half-life. Figure 3a shows that Hef1 mRNA half-life, measured by quantitative real-time PCR (RT-PCR), was similar in control and dioxin-treated cells, suggesting that this xenobiotic induces Hef1 at the transcriptional level. The contribution of AhR to this regulation was assessed using two different approaches; first, we treated the MDA-MB-231 mammary cells, which do not express

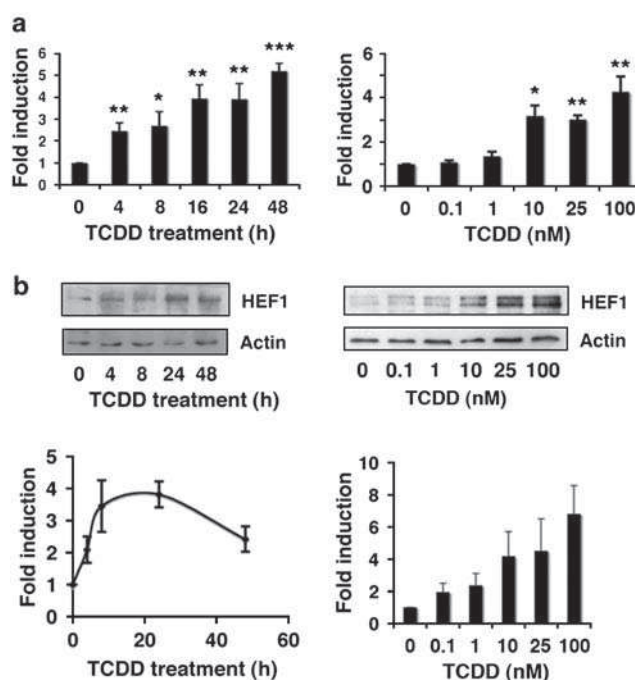


Figure 2 The metastasis marker Hef1 is an aryl hydrocarbon receptor target. (a) Quantitative real-time PCR of Hef1 mRNA levels in time-course (left panel) and dose-response (right panel, 48 h) studies of dioxin-treated cells. The single, double and triple asterisks indicate $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$ respectively, compared with controls. (b) Western blot analysis and quantification of Hef1 protein levels on time-course (left panel) and dose-response (right panel, 48 h) studies of dioxin-treated cells.

AhR, with dioxin (see Supplementary information SF3). We did not observe Hef1 mRNA induction as observed with AhR-expressing HepG2 and MCF-7 cells (Diry *et al.*, 2006). Next, we performed AhR mRNA knock-down with our validated siRNAs (Qiagen, Courtaboeuf, France) (see also Figures 1c and d). A significant reduction of AhR mRNA levels (40–60%) leads to a similar decrease in Hef1 and Cyp1A1 mRNA-induced levels (Figure 3b; and see Supplementary information SF2). Cytochrome P450 1A1 (Cyp1A1) is one of the most sensitive and classical markers of AhR activation. Interestingly, under untreated conditions, Hef1 mRNA levels were not affected by AhR siRNA transfection (Figure 3b). Finally, we analysed Hef1 human promoter using both *in silico* and *in vitro* approaches. Promoter sequence analysis reveals the presence of two putative consensus dioxin or xenobiotic responsive elements (XREs) in positions –780 and –648 (XRE1 and XRE2, respectively) (Figure 3c). We sub-cloned the –850/+4 Hef1 promoter fragment in a firefly luciferase reporter vector (pGL3 basic vector from Promega, Madison, WI, USA). Transfection experiments showed that the Hef1 promoter displayed a four fold activation by dioxin (Figure 3d). We also observed a significant 1.7-fold activation in MDA-MB-231 cells on transfection with both AhR and ARNT-expressing vectors (but not with one of them alone) (See Supplementary information in SF3B). To confirm our hypothesis, we carried out chromatin immunoprecipitation experiments to assay AhR promoter binding. Figure 3e (and

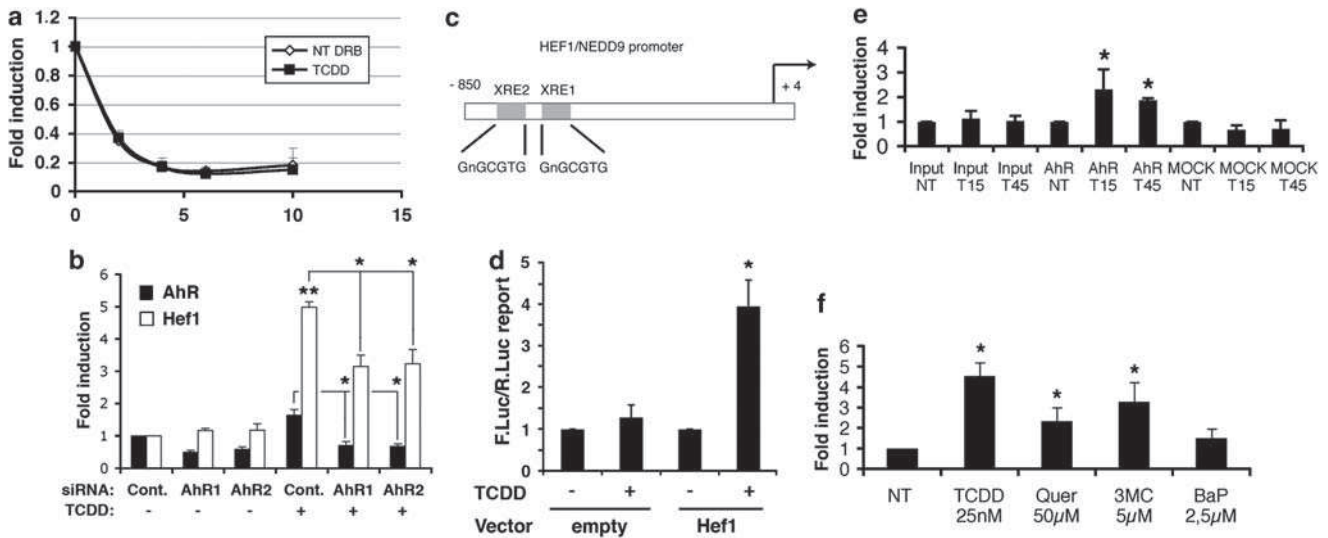


Figure 3 (a) Hef1 mRNA half-life measurement in HepG2 cells in both control and tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) treatment conditions. (b) Quantitative real-time PCR (RT-PCR) of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and Hef1 mRNA levels in AhR small interfering RNA (siRNA)-transfected HepG2 cells. Control siRNA (siC) was used as control. All the data are representative of at least three different experiments. Values are expressed as mean \pm s.e.m. The double and single asterisks indicate $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively, compared with controls. (c) Schematic representation of human Hef1 promoter (-850/+4) and of both xenobiotic responsive element (XRE). (d) Assessment of Hef1 promoter activity after HepG2 transfection of a vector containing the -916/-66 promoter region of Hef1 upstream of the firefly luciferase reporter gene. Cells were treated or not with dioxin for 48 h, and an empty vector was used as control. (e) Chromatin immunoprecipitation experiments carried out on the Hef1 promoter XRE region. (f) Quantitative RT-PCR of Hef1 mRNA levels on 48 h treatment of HepG2 cells with various AhR ligands (Quer: quercetin; 3MC: 3-methylcholanthrene; BaP: benzo(a)pyrene).

Supplementary information SF4 for the quantitative data and a similar experiment on the CYP1A1 promoter for a positive control) shows that after a 15 or 45 min treatment, dioxin significantly stimulated AhR recruitment to the region encompassing both XREs. Finally, we tested several AhR ligands on Hef1 mRNA induction and discovered that benzo(a)pyrene, quercetin and 3-methylcholanthrene induced Hef1 mRNA expression (Figure 3f). In conclusion, those experiments show that Hef1 is a transcriptional target of AhR.

Next, we investigated the role of this metastatic marker in the cellular changes associated with dioxin-exposed HepG2 cells by knockdown experiments using two targeted siRNA (named 143 and 528); we were able to downregulate dioxin-induced Hef1 expression with either siRNA (Figure 4a). However, knockdown using siRNA 528 was more potent particularly in dioxin treated cells; indeed, siRNA 528 efficiently lowers Hef1 protein expression by $> 50\%$ (Figure 4b). Interestingly, on dioxin treatment, we observed a decrease in the number of cells harboring crescent-like structures in the presence of siRNA 528 (Figure 4c) and a dramatic reduction of focal adhesion sites (Figure 4d). Thus, the downregulation of Hef1 impairs the effects of dioxin on cell shape and cytoskeleton organization.

We next studied other dioxin-induced cellular and molecular events related to epithelial-mesenchymal transition and investigated the role of Hef1 by RNA interference. First, we measured the expression level of the classical epithelial marker, E-cadherin in our system. E-cadherin allows the formation of adherens junctions in tissues and epithelial sheets. A decrease of this marker

is a hallmark of EMT (Thiery and Sleeman, 2006); in parallel, we also measured the activity of the stress kinases, JNK, which are classically phosphorylated by stress stimuli, loss of cell polarity and cell migration inducers (Huang *et al.*, 2004). We detected membrane expression of E-cadherin in HepG2 cells (Figure 5a, left panel). Interestingly, the staining sharply decreased on dioxin treatment (Figure 5a, right panel). We then monitored E-cadherin mRNA and protein levels in time-course experiments and, again, we were able to observe, for both samples, a dramatic decrease ($< 40\%$ of the initial levels) after a 48-h treatment (Figure 5b). Earlier time points did not show any changes in E-cadherin expression. In parallel, we observed an increase of JNK phosphorylation after a 24-h dioxin treatment (Figure 5b). Next, we investigated the effect of AhR and Hef1 siRNA on E-cadherin expression and JNK activation. Knockdown of AhR (see Supplementary information SF5) partially restores (82% of control levels) E-cadherin mRNA expression on dioxin treatment (Figure 5c). Interestingly, Hef1 siRNA 528 exerts the same effect (Figure 5d). As loss of E-cadherin expression is one condition that favors migration of epithelial cells, we tested the effect of dioxin and the contribution of Hef1 induction on HepG2 migration. We show that dioxin elicits a twofold increase in cell migration speed in wound healing assays (Figure 6a); this effect of dioxin was largely blunted in Hef1 siRNA 528-treated cells (Figure 6a). Under these conditions, migration speed was close to that of the control untreated cells. Consistent with our previous observations, siRNA 528 had no effect on the basal migration

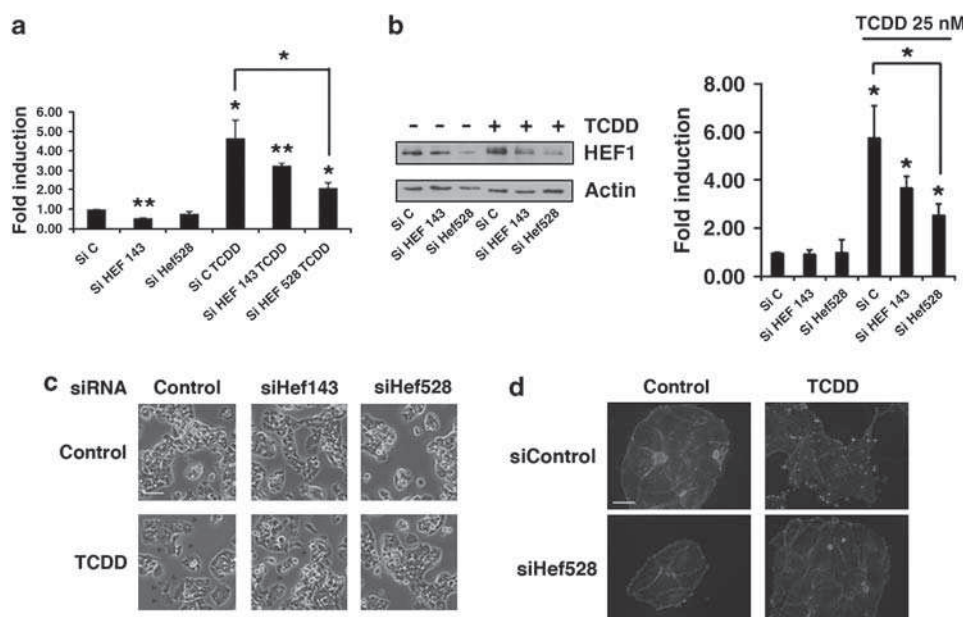


Figure 4 Downregulation of Hef1-induced levels by RNA interference impairs the effects of dioxin on cell shape and cytoskeleton organization. **(a)** Quantitative real-time PCR of Hef1 mRNA levels in Hef1 143 and 528 small interfering RNA (siRNA)-transfected HepG2 cells. Control siRNA (siC) was used as control and dioxin (25 nM) was used to induce Hef1. All the data are representative of at least three different experiments. Values are expressed as mean \pm s.e.m. The double and single asterisks indicate $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively, compared with controls. **(b)** Western blot analysis and quantification of Hef1 protein levels on siRNA transfection. Control siRNA (siC) was used as a transfection control; Hef1 143 and 528 siRNA were specifically used to target Hef1. Dioxin treatment (25 nM) was carried out 6 h after siRNA transfection. All the data are representative of at least three different experiments. Values are expressed as mean \pm s.e.m. The single asterisks indicates $P < 0.05$ compared with controls. **(c)** Phase contrast microscopy of siRNA-transfected HepG2 cells treated or not with dioxin (25 nM). Control siRNA (siC) and Hef1 siRNA (Hef1 143 and 528) were used to assess the role of Hef1. Hef1 528 transfection significantly reduces the number of crescent-shaped cells observed on dioxin treatment. Black arrows mark lamellipodia. Scale bar, 20 μ m. **(d)** Fluorescence microscopy revealing vinculin (green) or actin (red) of siRNA-transfected HepG2 cells treated or not with dioxin (25 nM). Hef1 528 transfection significantly reduces the number of focal adhesion sites and lamellipodia observed on dioxin treatment. Scale bar, 10 μ m. A full colour version of this figure is available at the *Oncogene* journal online.

speed level. The activation of cell migration by dioxin was confirmed using an additional assay, the Boyden chamber invasion assay (Figure 6b). Thus, in addition to its effect on cell shape and cytoskeleton organization, Hef1 seems to be critical for dioxin-mediated effects on cell migration, E-cadherin expression and JNK activation.

Discussion

The link that we describe here between AhR activation, Hef1 induction and cell plasticity may constitute a novel mechanism of pollutants toxicity, notably during development and cancer progression. Historically, AhR activation has been linked to induced expression of phase I and phase II xenobiotic enzymes, which facilitate pollutants and drugs clearance from metazoan organisms. However, recent studies have unveiled the regulation of new target genes (Frueh *et al.*, 2001; Diry *et al.*, 2006). Our experiments now establish Hef1 as an important member of this 'new' AhR target gene family, as was initially suggested by Frueh *et al.* (2001). Our initial observations of HepG2 morphological changes on dioxin treatment led us to search for dioxin-upregulated targets, which were putatively involved in

the regulation of cell attachment, adhesion and migration. This study validates Hef1 as an AhR target for the first time.

There is now a clear connection between Hef1 expression and cancer progression both from clinical and experimental studies (Kim *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2007). Indeed, overexpression of this gene has been implicated in the regulation of cell migration (O'Neill and Golemis, 2001; Natarajan *et al.*, 2006; Regelman *et al.*, 2006), which might explain its potential role in cancer progression (Kim *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2007). Several cellular pathways involving Hef1 have been described in the past few years that could explain this phenomenon. First, Hef1 acts as a scaffold protein for integrin signaling, which regulates cell anchorage and migration (Seo *et al.*, 2006). Moreover, its 'organizing' role on primary cilium and mitotic spindle formation could also be related to cell differentiation and consequently, cancer development (Pugacheva and Golemis, 2005; Pugacheva *et al.*, 2007). Hef1 expression levels seem to be critical in order to allow proper function of those different cell structures. Indeed, depletion of Hef1 by RNA interference leads to abnormal centrosome formation, whereas its overexpression induces supernumerary centrosomes and multipolar mitotic spindles (Pugacheva and Golemis, 2005, 2006). Thus, the

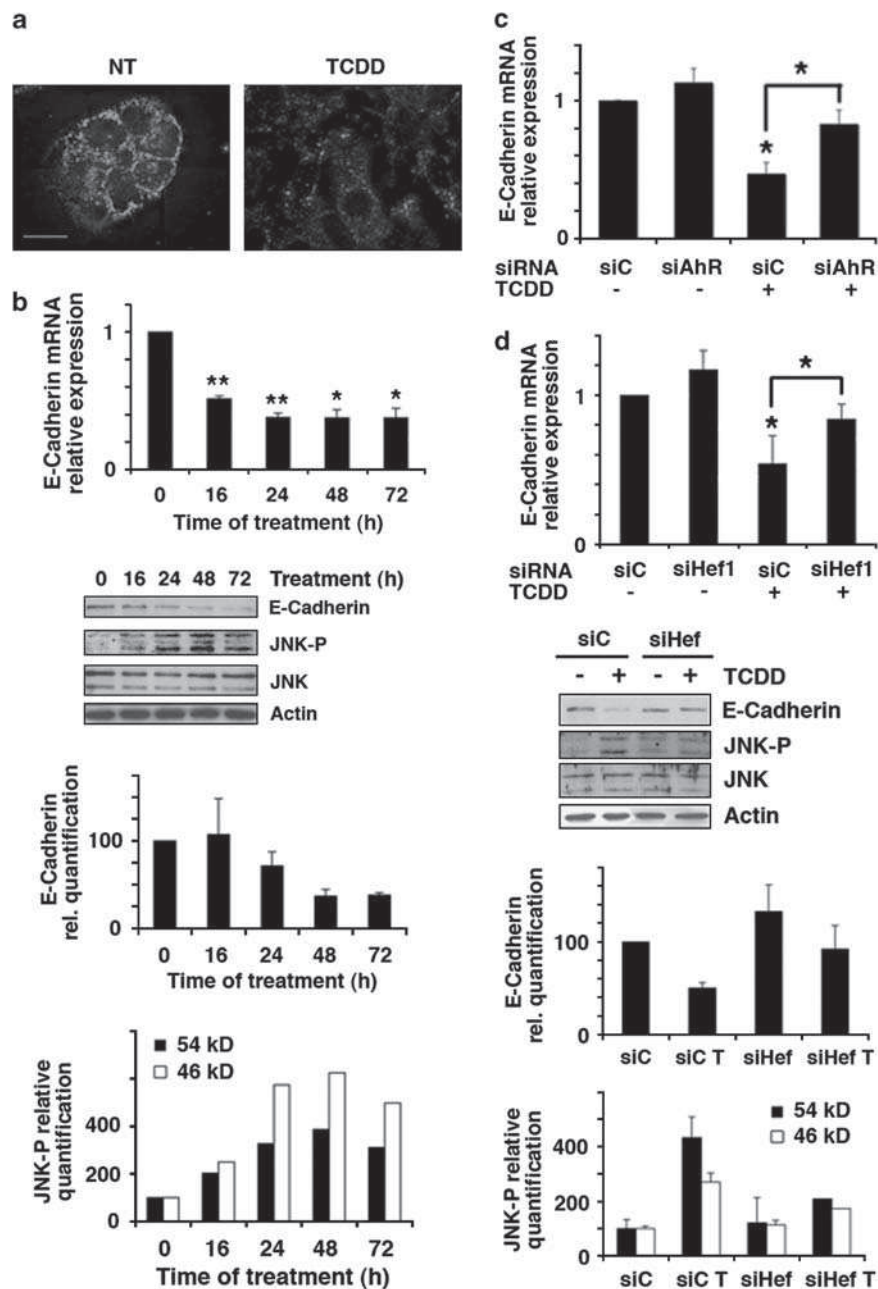


Figure 5 Dioxin-induced Hef1 expression regulates E-cadherin expression and Jun N-terminal kinase (JNK) activation. (a) Fluorescence microscopy of HepG2 cells treated or not with dioxin (25 nM). After 48 h treatment, HepG2 were fixed and immunostained with an E-cadherin antibody. Dioxin decreases E-cadherin membrane expression. Scale bar, 10 μ m. (b) Quantitative real-time (RT-PCR) of E-cadherin mRNA levels on time-course studies of dioxin treatment (upper panel); western blot analysis and quantification of E-cadherin, JNK-P and JNK protein levels on kinetics conditions of dioxin treatment (lower panel). (c) Quantitative RT-PCR of E-cadherin mRNA levels in aryl hydrocarbon receptor small interfering RNA (siRNA)-transfected HepG2 cells on dioxin treatment (25 nM). Control siRNA (siC) was used as control. (d) Quantitative real-time PCR of E-cadherin mRNA levels in Hef1 528 siRNA-transfected HepG2 cells (upper panel); western blot analysis and quantification of E-cadherin, JNK and JNK-P protein levels in Hef1 528 siRNA-transfected HepG2 cells (lower panel). Control siRNA (siC) was used as control and dioxin (25 nM) was used to induce Hef1. All the data are representative of at least three different experiments. Values are expressed as mean \pm s.e.m. The double and single asterisks indicate $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively, compared with controls. A full colour version of this figure is available at the *Oncogene* journal online.

observed regulation of Hef1 by AhR may be relevant to account for developmental and migration-related toxicities of environmental pollutants. These observations open the possibilities that pollutants could trigger cancer cell migration and suggest that further studies will be

needed to decipher a potential action of xenobiotics in the regulation of metastatic progression.

Chronic exposure to AhR ligands is very common, especially in industrialized countries. Moreover, dioxins tend to accumulate in adipose and hepatic tissues because

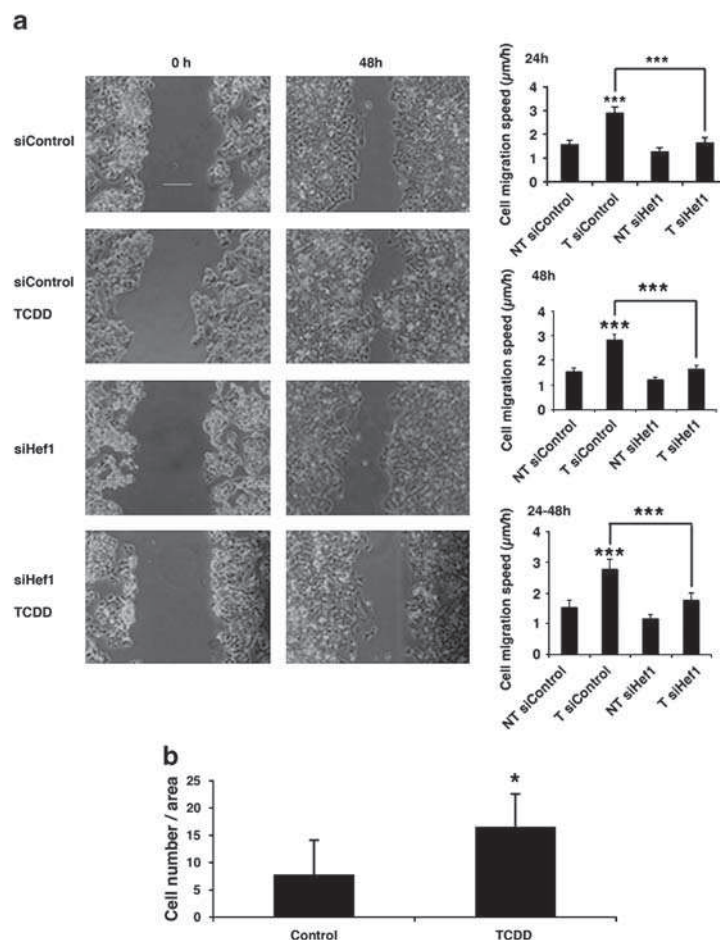


Figure 6 (a) Dioxin-induced Hef1 expression regulates cell migration. HepG2 confluent cell monolayers were subjected to a wound-healing assay to monitor cell motility. Hef1 528 transfection was carried out 1 day after cell seeding and dioxin treatment 6 h after transfection. Vehicle- or tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-pretreated cells were wounded in serum-free medium using a standard 200 μ l pipette tip. The wounded areas were photographed at different time points. Quantification of cell migration speed was carried out and results are presented in the right part of the panel. Dioxin significantly increases HepG2 cells migration speed, whereas impairment of Hef1 induction by RNA interference significantly reduces it. Scale bar, 75 μ m. (b) Effect of TCDD on HepG2 cell invasiveness. Cells were grown in a Biocoat Matrigel invasion chamber and treated or not with 25 nM TCDD. After 48 h, cells that invaded through the filters were fixed, stained with crystal violet and counted under the microscope. All the data are representative of at least three different experiments. Values are expressed as mean \pm s.e.m. The single and triple asterisks indicate $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively, compared with controls.

of their low chemical reactivity and high hydrophobicity; their long half-life (7–8 years) in humans might be responsible of long-term effects even after acute contamination. Hef1 upregulation by AhR ligands might not be critical for the first steps of cancer development, such as initiation and promotion. However, considering the clinical observations revealing Hef1 as a marker of metastatic cells, we hypothesize that its induction by pollutants in primary tumors might favor cancer progression. Thus, in addition to their effects on tumor initiation and promotion, some xenobiotics could trigger cellular conditions that favor tumor progression, as suggested here for AhR ligands. In addition, humans and animals are chronically exposed to complex mixtures of pollutants, rather than to a single one. Some of these pollutants are known to act as tumor initiators and/or tumor promoters, but one can speculate that some xenobiotics may act as tumor ‘progressors’, possibly in combination with genetic, inflammatory or nutritional conditions. Although a

variety of endogenous hormones or signaling factors have been suspected to favor metastasis (Aguirre-Ghiso, 2007), little is known in this field on the effects of pollutants. Three independent studies examined cytochrome P450 profile expression in different metastatic tumors and found a significant upregulation of some AhR-target members, including CYP1B1, CYP2S1 and aromatase CYP19 (Downie *et al.*, 2005; Kumarakulasingham *et al.*, 2005; Haas *et al.*, 2006), which is in line with our hypothesis. However, the mechanisms of these upregulations remain elusive particularly because other cytochrome P450 genes are also increased. These observations indicate that additional studies in human populations exposed to high levels of pollutants are required and should attempt to correlate such exposure with tumor aggressiveness and metastasis.

The cellular effects of dioxin that we describe here have been observed in the context of a cancerous human cell line. It is unclear at this stage whether dioxin and the

human AhR would activate *in vivo* cell migration under any physiological or pathological conditions. In this regard, it is interesting to note that the invertebrate AhR, specifically in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila*, does not seem to mediate response to xenobiotics but is rather at least partially implicated in determining neuronal fate and migration, which is in line with our observations (Crews and Brenman, 2006; Qin *et al.*, 2006; Wernet *et al.*, 2006; McMillan and Bradfield, 2007). Studies of rodent AhR lead to a more balanced view of its functions (McMillan and Bradfield, 2007). Indeed, although AhR knockout mice exhibit developmental defects, these defects are not evidently due to a lack of epithelial to mesenchymal transition. In fact, it has been reported that one of the classical plasticity markers, transforming growth factor- β , is actually downregulated by dioxin and AhR activation in experimental setups in rodents (Puga *et al.*, 2005). At this stage, in analogy with the endocrine disrupting concept of environmental pollutants, we speculate that dioxin activation of AhR might lead to a disruption of endogenous AhR signaling and that dioxin-activated AhR acts essentially as a cellular transition modulator, favoring cell migration and EMT as we have shown in this study, but also altering some plasticity-related developmental processes in other contexts.

Materials and methods

Cell culture

Human hepatoblastoma HepG2 and mammary MDA-MB-231 cells were cultured at 37°C in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) complemented with nonessential amino acids, supplemented with 10% fetal bovine serum, 200 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 0.5 mg/ml amphotericin B (Bristol-Myers Squibb Co., Stamford, CT, USA) in a humidified atmosphere in 5% CO₂. One day before treatment with various concentrations of TCDD, cells were cultivated in DMEM without phenol red supplemented with 3% charcoal-treated (deteriorized) calf serum and maintained in this medium during all treatments. TCDD was purchased from LCG Promochem (Molsheim, France). Benzo(a)pyrene, 3-methylcholanthrene and quercetin were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, US). Photographs were taken with an inverted microscope (Nikon TMS-F, 301655, Nikon FRANCE SAS, Champigny sur Marne, France) equipped with a digital camera (Nikon Digital shot DS-L1).

HEF1 mRNA half-life measurement

On day 1, HepG2 cells were seeded at 400 000 cells per well (in 6-well plates) in complete DMEM medium (see above). On day 2, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and medium was changed for red phenol-free DMEM supplemented with 3% dexteroideized fetal bovine serum, 200 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 0.5 mg/ml amphotericin B. Cells were treated with 25 nM TCDD. Twenty-four hours later (on day 3), cells were treated with 100 µM 5,6-dichloro-beta-D ribofuranosyl benzimidazole (Sigma-Aldrich) and lysates were recovered for each mentioned time points (2, 4, 6 and 10 h) using the RNeasy mini kit (Qiagen) (see also below). Quantitative RT-PCR was then carried out (see also below).

siRNA transfection

One day before transfection, HepG2 cells (4×10^5 cells per well) were seeded in 6-well plates. Twenty-four hours later, the medium was replaced by DMEM without phenol red supplemented with 3% charcoal-treated (deteriorized) calf serum and cells were then transfected with 5 nM siRNA, using the HiPerfect transfection reagent (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. For Hef1 experiments, after 8 h of incubation at 37°C, medium was replaced and cells were treated or not with 25 nM TCDD. Seventy-two hours after transfection, RNA and protein purification or cell immunofluorescence were carried out. For AhR experiments, cells were treated with 25 nM TCDD 16 h after transfection and extraction or immunostaining were performed 48 h after transfection. siRNA references and/or sequences (Qiagen) are:

siHef1 528: Hs_NEDD9_1_HP (ref: SI00657363); siHef1 143: Hs_NEDD9_4_HP (ref: SI00657384); siAhR1: Hs_AHR_5_HP Validated siRNA (ref: SI02780148); si AhR2: Hs_AHR_6_HP Validated siRNA (ref: SI03043971); siControl: GFP Custom siRNA (ref: 1027020).

Reporter assays

The -850/+4 human Hef1 promoter (NM_182966.2) was amplified by PCR and ligated in the polylinker sequence of pGL3 basic vector (Promega). Transfection experiments were carried out as follows: cells were seeded on 6-well plates (3×10^5 cells per well), then 24 h later, the medium was replaced with DMEM without phenol red supplemented with 3% charcoal-treated calf serum and transfection experiments were carried out with lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. pCT131 empty vector was used as sequence control and pgluc-Renilla luciferase as transfection control. Cells were treated 24 h after transfection with 25 nM dioxin. After an overnight incubation, cells were homogenized for enzymatic assays with phosphate lysis buffer (Promega). A dual luciferase assay (firefly and *Renilla*) was carried out with a Promega kit and a luminometer. The RL assay was used to normalize the transfection efficiency in all culture dishes. Blanks were obtained by assaying luciferase activity in mock-transfected cells. For the MDA-MB-231 experiments, we used similar transfection conditions with, in addition to the HEF1 promoter construct, 100 ng of empty, human AhR- or human ARNT-expressing vectors per well (a generous gift of Dr J-F Savouret, INSERM UMR-S 747, France).

Chromatin immunoprecipitation

The detailed protocol is provided as a Supplementary Information (SI-1).

Wound-healing assay

HepG2 cells (1×10^6 cells per well) were seeded on 6-well plates. Twenty-four hours later, the cells were cultivated in DMEM without phenol red supplemented with 3% charcoal-treated calf serum overnight and transfected with siHef1 528 or control as previously described. Six hours later, cells were treated with 25 nM dioxin. Twenty-four hours after transfection, HepG2 were wounded in serum-free medium, 1% bovine serum albumin (BSA) with a sterile 200 µl pipette tip to remove cells. After washing away suspended cells, treatment with 25 nM TCDD was continued. The progress of migration was photographed (after identification of each wounded zone) in six regions, immediately and during 2 days after wounding (0 h–24 h–48 h), using an inverted microscope (Nikon TMS-F, 301655) equipped with a digital camera (Nikon Digital shot DS-L1).

RNA extraction, reverse transcription and quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen) as described by the manufacturer and quantified with a spectrophotometer (ND-1000 Nanodrop, NanoDrop products, Wilmington, DE, USA). Reverse transcription was carried out on each RNA sample (2 µg) using the cDNA High-Capacity Archive kit from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France) in a final reaction volume of 50 µl according to the manufacturer's instructions. All specific oligonucleotides were designed using the OLIGO Explorer software (Molecular Biology Insights, Inc, Cascade, CO, USA). Gene-specific primers used for RT-PCR reactions are HEF-1: forward 5'-TGAGAGGCAACAGAAAGAGC-3' and reverse 5'-GAGAAGGGAAATGAAATGGG-3'; E-Cad: forward 5'-CAGAGGGAGGATTTTGAGC-3' and reverse 5'-GTGAAGGGAGATGTATTGGG-3'; AhR: forward 5'-ACATCACCTACGCCAGTCGC-3' and reverse 5'-TCTA TGCCGCTTGGAAAGGAT-3'; CYP1A1: forward 5'-GACCA CAACCACCAAGAAC-3' and reverse 5'-AGCGAAGAATA GGGATGAAG-3', and for control RPL13A: forward 5'-CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3' and reverse 5'-GAGGACCTCTGTGTATTGTCAA-3'. Oligonucleotides were obtained from Qiagen (Les Ulis, France). Quantitative RT-PCR was carried out with 40 ng of the cDNA, 300 nm of each primer and Absolute QPCR SYBR Green (Abgene, Villebon sur Yvette, France) to a final volume of 10 µl. Quantitative RT-PCR measurements were carried out on an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). PCR cycles were proceeded as follows: Taq activation (15 min), denaturation (15 s, 95 °C), and annealing and extension (1 min, 60 °C). The melting-curve analysis showed the specificity of the amplifications. Threshold cycle, which inversely correlates with the target mRNA level, was measured as the cycle number at which the reporter fluorescent emission appears above the background threshold. The relative mRNA levels were estimated using the delta-delta method with RPL13A as reference gene. The PCR primer, RPL13A, was designed using Oligo Explorer software and its quantitative reverse transcription-PCR was carried out with Absolute quantitative PCR SYBR Green.

Immunoblotting

Whole-cell lysates were prepared from HepG2 cells in M-PER mammalian protein extraction reagent containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma). Equal amounts of total protein were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes. Blots were probed with primary antibodies that recognize HEF-1 (ImmuQuest, IQ297, 1:5000, North York-shire, UK), E-cadherin (Cell Signaling, 4065, 1:1000, Danvers, MA, USA), phospho-SAPK/JNK (Cell Signaling, 9251, 1:1000), SAPK/JNK (Cell Signaling, 9252, 1:1000) and actin (Abcam, ab37063, 1:10000, Paris, France). Signals from immunopositive bands were visualized on X-ray film using alkaline phosphatase-linked secondary antibody (Applied Biosystems, T2191 or T2192, 1:20000) and an enhanced chemiluminescence system CDP-Star (Applied Biosystems). Quantifications were carried out with ImageJ freeware (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) after scanning of the different blots.

Immunofluorescence

Different antibodies were used: mAb anti-HEF1 (clone 2G9, ImmuQuest), mAb anti-vinculin (clone hVIN-1, Sigma) and mAb anti-E-cadherin (clone 36, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA USA). HepG2 cells were seeded on glass

coverslips 72 h before being processed for immunofluorescence ($\sim 5 \times 10^5$ cells per well in 6-well plates). Treatments with TCDD (25 nM) were carried out for 48 h in DMEM without phenol red and supplemented with 3% charcoal-treated calf serum. For immunofluorescence, all steps were carried out at room temperature. The coverslips were washed twice in $1 \times$ PBS and then fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min. The cells were permeabilized for 10 min in 0.5% PBS-Triton and incubated in 1% PBS-BSA for 10 min. The primary antibody incubations were carried out for 1 h at room temperature at a dilution of 1:50 (HEF1), 1:400 (vinculin) and 1:100 (E-cadherin) in 1% PBS-BSA. Secondary antibody (Alexa Fluor 488 dye-conjugated anti-mouse antibody, Invitrogen SARL, Cergy-Pontoise, France) was diluted in 1% PBS-BSA and incubated with the slides for 1 h at room temperature. For actin staining, TRITC-conjugated phalloidin was included during incubation with the secondary antibody. The coverslips were sealed by Vectashield mounting medium (Abcys, Paris, France) for fluorescence with 4,6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) and images were acquired using Nikon Eclipse TE-2000 E microscopy. Deconvolution and 3D reconstitution was applied using Autoquant imaging Autodeblur version X 1.4.1 (AutoDebur & Autovisualize, Mediacybernetics, Bethesda, MD, USA).

Matrigel invasion assay

Cell invasion was measured using matrigel-coated film insert (8-µm pore size) fitting into 24-well invasion chambers (Beckon-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). HepG2 cells (5×10^4), which were resuspended in 500 µl DMEM without phenol red and supplemented with 1% BSA, were added to the upper compartment of the invasion chamber in presence or absence of 25 nM TCDD. Medium containing 10% FBS in presence or absence of 25 nM TCDD was placed in the lower compartment of the invasion chamber to act as a chemoattractant. After 48-h incubation at 37 °C in a 5% CO₂ incubator, the non-invading cells on the upper surface of the filter was wiped off using cotton swabs. Cells that invaded through the filters were fixed, stained with crystal violet and counted under the microscope by selecting four fields per filter ($\times 20$ magnification). Values obtained were calculated by averaging the total number (four fields of each triplicate filter).

Statistical analysis

All the data are representative of at least three different experiments. Values are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical analysis was carried out using successively the Mann-Whitney's *U*-test (nonparametric comparison of two independent series) or H Kruskal-Wallis test (nonparametric comparison of *k* independent series) followed by a one-factor analysis of variance test (parametric comparison of *k* independent series).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail; all authors); ANR (Agence Nationale de la Recherche, 06SEST26, Oncopop; all authors); ARC (Association pour la

Recherche sur le Cancer, 3927; all authors); Fondation pour la Recherche Médicale (Bourse postdoctorale, Linh-Chi Bui); INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; all authors); Ligue contre le Cancer (Bourse

postdoctorale, Linh-Chi Bui); Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (Bourse doctorale, Aline Chevalier); Région Ile de France (bourse doctorale, Stéphane Pierre); Université Paris Descartes.

References

- Aguirre-Ghiso JA. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* **7**: 834–846.
- Crews ST, Brenman JE. (2006). Spineless provides a little backbone for dendritic morphogenesis. *Genes Dev* **20**: 2773–2778.
- Diry M, Tomkiewicz C, Koehle C, Coumoul X, Bock KW, Barouki R et al. (2006). Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene* **25**: 5570–5574.
- Downie D, McFadyen MC, Rooney PH, Cruickshank ME, Parkin DE, Miller ID et al. (2005). Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clin Cancer Res* **11**: 7369–7375.
- Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock Jr JP. (2001). Use of cDNA microarrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression. *Toxicol Lett* **122**: 189–203.
- Haas S, Pierl C, Harth V, Pesch B, Rabstein S, Bruning T et al. (2006). Expression of xenobiotic and steroid hormone metabolizing enzymes in human breast carcinomas. *Int J Cancer* **119**: 1785–1791.
- Huang C, Jacobson K, Schaller MD. (2004). A role for JNK-paxillin signaling in cell migration. *Cell Cycle* **3**: 4–6.
- Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, Fan C, McNamara K, Kozlowski P et al. (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* **448**: 807–810.
- Kim M, Gans JD, Nogueira C, Wang A, Paik JH, Feng B et al. (2006). Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* **125**: 1269–1281.
- Kohle C, Bock KW. (2007). Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem Pharmacol* **73**: 1853–1862.
- Kumarakulasingham M, Rooney PH, Dundas SR, Telfer C, Melvin WT, Curran S et al. (2005). Cytochrome p450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis. *Clin Cancer Res* **11**: 3758–3765.
- Law SF, Estojak J, Wang B, Mysliwiec T, Kruh G, Golemis EA. (1996). Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 3327–3337.
- Law SF, O'Neill GM, Fashena SJ, Einarson MB, Golemis EA. (2000). The docking protein HEF1 is an apoptotic mediator at focal adhesion sites. *Mol Cell Biol* **20**: 5184–5195.
- Ma Q, Whitlock Jr JP. (1996). The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol Cell Biol* **16**: 2144–2150.
- Marchand A, Tomkiewicz C, Marchandau JP, Boitier E, Barouki R, Garlatti M. (2005). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression and counteracts the negative effect of insulin. *Mol Pharmacol* **67**: 444–452.
- McMillan BJ, Bradfield CA. (2007). The aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 1412–1417.
- Mulero-Navarro S, Pozo-Guisado E, Perez-Mancera PA, Alvarez-Barrientos A, Catalina-Fernandez I, Hernandez-Nieto E et al. (2005). Immortalized mouse mammary fibroblasts lacking dioxin receptor have impaired tumorigenicity in a subcutaneous mouse xenograft model. *J Biol Chem* **280**: 28731–28741.
- Natarajan M, Stewart JE, Golemis EA, Pugacheva EN, Alexandropoulos K, Cox BD et al. (2006). HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene* **25**: 1721–1732.
- O'Neill GM, Golemis EA. (2001). Proteolysis of the docking protein HEF1 and implications for focal adhesion dynamics. *Mol Cell Biol* **21**: 5094–5108.
- Puga A, Tomlinson CR, Xia Y. (2005). Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem Pharmacol* **69**: 199–207.
- Pugacheva EN, Golemis EA. (2005). The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol* **7**: 937–946.
- Pugacheva EN, Golemis EA. (2006). HEF1-aurora A interactions: points of dialog between the cell cycle and cell attachment signaling networks. *Cell Cycle* **5**: 384–391.
- Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* **129**: 1351–1363.
- Qin H, Zhai Z, Powell-Coffman JA. (2006). The *Caenorhabditis elegans* AHR-1 transcription complex controls expression of soluble guanylate cyclase genes in the URX neurons and regulates aggregation behavior. *Dev Biol* **298**: 606–615.
- Regelmann AG, Danzl NM, Wanjalla C, Alexandropoulos K. (2006). The hematopoietic isoform of Cas-HeF1-associated signal transducer regulates chemokine-induced inside-out signaling and T cell trafficking. *Immunity* **25**: 907–918.
- Seo S, Ichikawa M, Kurokawa M. (2006). Structure and function of cas-L and integrin-mediated signaling. *Crit Rev Immunol* **26**: 391–406.
- Thiery JP, Sleeman JP. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 131–142.
- Wernet MF, Mazzoni EO, Celik A, Duncan DM, Duncan I, Desplan C. (2006). Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic for colour vision. *Nature* **440**: 174–180.
- Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR. (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* **16**: 453–460.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)



Induction of the Ras activator Son of Sevenless 1 by environmental pollutants mediates their effects on cellular proliferation

Stéphane Pierre^{a,b,1}, Anne-Sophie Bats^{a,b,c,1}, Aline Chevallier^{a,b}, Linh-Chi Bui^{a,b}, Ariane Ambolet-Camoit^{a,b}, Michèle Garlatti^{a,b}, Martine Aggerbeck^{a,b}, Robert Barouki^{a,b,d}, Xavier Coumoul^{a,b,*}

^a INSERM UMR-S 747, Toxicologie Pharmacologie et Signalisation Cellulaire, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France

^b Université Paris Descartes, Centre universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France

^c AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Chirurgie Gynécologique Cancérologique, 75015 Paris, France

^d AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Biochimie Métabolique, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2010

Accepted 5 October 2010

Keywords:

Dioxin

AhR

SOS1

Ras

Cell proliferation

ABSTRACT

TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin), a highly persistent environmental pollutant and a human carcinogen, is the ligand with the highest affinity for the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) that induces via the AhR, xenobiotic metabolizing enzyme genes as well as several other genes. This pollutant elicits a variety of systemic toxic effects, which include cancer promotion and diverse cellular alterations that modify cell cycle progression and cell proliferation. Large-scale studies have shown that the expression of Son of Sevenless 1 (SOS1), the main mediator of Ras activation, is one of the targets of dioxin in human cultured cells. In this study, we investigated the regulation of the previously uncharacterized SOS1 gene promoter by the AhR and its ligands in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2. We found that several environmental pollutants (AhR ligands) induce SOS1 gene expression by increasing its transcription. Chromatin immunoprecipitation experiments demonstrated that the AhR binds directly and activates the SOS1 gene promoter. We also showed that dioxin treatment leads to an activated Ras-GTP state, to ERK activation and to accelerated cellular proliferation. All these effects were mediated by SOS1 induction as shown by knock down experiments. Our data indicate that dioxin-induced cellular proliferation is mediated, at least partially, by SOS1 induction. Remarkably, our studies also suggest that SOS1 induction leads to functional effects similar to those elicited by the well-characterized oncogenic Ras mutations.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The Ras signaling pathway is involved in cell growth and differentiation. Mutations in the Ras proto-oncogene have been described in a large variety of human malignancies [1]. These mutations result in a constitutively active Ras protein, which is one of the most common Ras dysregulations in cancers [1,2]. Three different Ras genes encoding the H-Ras, K-Ras and N-Ras 21 kDa proteins were discovered 30 years ago [1,3]. The activated Ras proteins physically associate with and activate Raf-1, a serine/threonine kinase which triggers a kinase cascade that results in the activation of the extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs of the MAPK family). Ras acts as a functional hub by

activating multiple downstream pathways that participate in cell growth and differentiation. The activity of Ras is regulated by two sets of proteins: guanine-nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs). GEFs stimulate the release of the Ras bound GDP which then allows GTP to bind and activate Ras. Conversely, GAPs stimulate Ras GTPase activity and lead to the basal GDP-bound state.

Several pathways, which lead to the active Ras state, have been described in mammalian cells. The best-characterized pathway employs the activation of tyrosine kinase receptors to elicit binding of various proteins to the phosphorylated receptor, most notably the growth factor receptor bound 2 (Grb2) protein bound to the guanine nucleotide exchange factor SOS1. The complex is targeted to the plasma membrane, allowing the GEF function of SOS1 to activate Ras by GDP/GTP exchange [4–6]. SOS1 can activate other GTP-binding proteins [4] and other effectors also control Ras activity. The most extensively characterized non-physiological conditions under which increased SOS activity has been observed result from gain of function mutations. For example, SOS1

* Corresponding author at: INSERM UMR-S 747 45 rue des Saints Pères 75006 Paris, France. Tel.: +33 1 42 86 33 59; fax: +33 1 42 86 38 68.

E-mail address: xavier.coumoul@parisdescartes.fr (X. Coumoul).

¹ These authors contributed equally to this work.

mutations have been described in the Noonan syndrome, a developmental disorder that is characterized by short stature, facial dysmorphism, congenital heart defects and skeletal anomalies [7,8]. These gain of function mutations, which lead to the activation of Ras and were the first examples of activating GEF mutations associated with human disease. Surprisingly, the implications of increased expression of SOS proteins have not been addressed and little is known about the regulation of the gene promoter.

Dioxin is a member of the polychlorinated dibenzo dioxins (PCDD) family which is a class of highly persistent environmental contaminants. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD), the most extensively characterized dioxin, has been classified in 1997 as a “human carcinogen” by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [9]. This pollutant is the ligand with the greatest affinity for the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). TCDD via the AhR, induces various toxicities including chloracne, wasting syndrome, teratogenicity, immunotoxicity, neurotoxicity, tumor promotion and carcinogenesis [10]. The AhR is a cytosolic, ligand-activated transcription factor which, upon activation, translocates to the nucleus where it forms a heterodimer complex with AhR nuclear translocator (ARNT). This complex binds to specific xenobiotic responsive elements (XRE) which are characterized by a 5′-GCGTG-3′ consensus core and induces specific target genes which include xenobiotic metabolizing enzymes (XME) such as the cytochrome P450 (CYP) 1 family [11]. In addition to detoxification functions, the activation of this receptor has been shown to elicit diverse cellular effects including cell proliferation [12,13]. These cellular alterations might mediate part of the long-term toxicity of the AhR ligands in animals and humans [14]. Indeed, AhR-null mice display several defects of development and proliferation including thymus and liver hypotrophy [15]. Numerous studies using AhR defective cells or AhR invalidating strategies have clearly established a role for this receptor in cell cycle regulation and proliferation [16]. The dysregulation of these cellular pathways may disrupt normal fetal development and favor cancer progression. The AhR gene targets that are involved in the proliferative effects of this receptor are not completely identified. To this end, we have examined large-scale toxicogenomic analyses of dioxin effects and focused on regulatory proteins that control cellular growth, in particular, the main mediator of Ras activation, SOS1.

In the present work, we investigated, for the first time, the regulation of the previously uncharacterized SOS1 gene promoter by the AhR and its ligands in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2. We show that several environmental pollutants (AhR ligands) induce SOS1 gene expression via increased transcription. Moreover, considering the critical role of SOS1 in controlling Ras activity, we also demonstrate that induction of SOS1 by AhR ligands leads to a predominant Ras-GTP state, to MAPK activation and to cell growth. The results point towards SOS1 gene induction as being a critical step for the carcinogenic effects mediated by dioxins.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Human hepatocarcinoma HepG2 cells were cultured in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with nonessential amino acids and containing 10% fetal bovine serum, 200 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin (Invitrogen) and 0.5 U/mL amphotericin B (Bristol-Myers Squibb Co., Stamford, CT) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The day before with the addition of various concentrations of TCDD, cells were cultured in DMEM

without phenol red and supplemented with 3% charcoal-treated (deteriorized) calf serum. Cells were maintained in this medium during all the treatments except for the proliferation studies. TCDD was purchased from LCG Promochem (Molsheim, France). Benzo(a)pyrene, and quercetin were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, United States).

2.2. RNA extraction, reverse transcription and quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Les Ulis France) and reverse transcription was performed with each RNA sample using the cDNA high-capacity archive kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) as previously described [17]. Specific oligonucleotides were designed using the OLIGO Explorer software (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO). Gene specific primers used for the real time PCR were: *SOS1*: forward 5′-TGAGAGGCAA-CAGAAAGAGC-3′ and reverse 5′-GAGAAGGGAATGAAATGGG-3′; *AhR*: forward 5′-ACATCACCTACGCCAGTCGC-3′ and reverse 5′-TCTATGCCGCTTGAAGGAT-3′; *RPL13A*: forward 5′-CCTGGAGGA-GAAGAGGAAAGAGA-3′ and reverse 5′-GAGGACCTCTGTATTTGT-CAA-3′. Oligonucleotides were obtained from (Qiagen). Quantitative RT-PCR was carried out in a 10 µL reaction volume containing 40 ng of cDNA, 300 nM of each primer and Absolute™ QPCR SYBR® Green (Abgene, Villebon sur Yvette, France). Quantitative RT-PCR measurements were performed on an ABI Prism 7900 Sequence Detector system (Applied Biosystems). PCR cycles consisted of the following steps: Taq activation (15 min, 95 °C), denaturation (15 s, 95 °C) and annealing and extension (1 min, 60 °C). The threshold cycle (Ct), which is inversely correlated to the amount of target mRNA, was measured as the number of cycles for which the reporter fluorescent emission first exceeds the background. The relative amounts of mRNA were estimated using the $\Delta\Delta C_t$ method with RPL13A as reference.

2.3. Immunoblotting

Whole cell lysates were prepared as previously described [17] from HepG2 cells with M-PER®, Mammalian Protein Extraction Reagent, containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich, St Louis, United States). Equal amounts of total protein were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Orsay, France). The membranes were probed with primary antibodies recognizing SOS1 (Upstate, Molsheim, France, 07-337, 1:2000), Actin (Abcam, Paris, France ab37063, 1:10000), AhR (Abcam, ab2770, 1:1000), ERK-Phosphorylated (Cell signaling, Saint Quentin en Yvelines, France 9101, 1:2000), ERK (Cell signaling, 4695, 1:2000) and Ras (Upstate 05-516, 1:10000). Immunoreactive bands were detected with X-ray film using alkaline phosphatase-linked secondary antibody (Applied biosystems, T2191 or T2192, 1:20000) and an enhanced chemiluminescence system CDP-Star® (Applied biosystems). Relative Quantification of the amount of immunoreactive material was performed with ImageJ freeware (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.4. SOS1 mRNA half-life measurement

On day 1, HepG2 cells were seeded at 400,000 cells/well (in 6-well plates) in complete DMEM medium (see above). On day 2, cells were washed with PBS and the medium was replaced by red phenol-free DMEM supplemented with 3% dexteroidezed fetal bovine serum, 200 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 0.5 mg/mL amphotericin B. Then TCDD dissolved in medium (1 µM). Fifty microlitre was added to the cells medium to give a final concentration of 25 nM. Twenty-four hours later (on Day 3), cells were treated with 100 µM DRB (5,6-dichloro-beta-D ribofur-

anosyl benzimidazole, Sigma–Aldrich) and lysates were extracted at 0, 2, 4, 6, 10 and 12 h after the addition of DRB using the RNeasy mini kit (Qiagen) Quantitative real-time PCR was then performed.

2.5. *In silico* analysis and primer extension

In silico analysis was performed with MatInspector[®] software (Genomatix, Munich, Germany) to identify all the potential consensus responsive elements in the promoter. For the primer extension study, total RNAs were extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen) as described. Primer extension experiments were performed with the Primer Extension System-AMV Reverse Transcriptase kit (E3030, Promega, Charbonnières les Bains, France). Positive and negative controls are provided with the Kit from Promega. A specific primer was designed (+100 5'-GGGACCCCGCTTCCCGCCGAGC-3' +123) (+ 1 refers to translation start site) and labeled with [γ^{32} P]ATP (Easytides, BLU502A001MC, PerkinElmer, Courtaboeuf, France). The reverse transcription product was separated on a denaturing acrylamide gel. After migration, radioactive bands were visualized with a phosphorimager (STORM 580).

2.6. siRNA transfection

The day before the transfection, HepG2 cells (4×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates. The medium was replaced the day of the transfection by DMEM, without phenol red, supplemented with 3% charcoal-treated (deteriorized) calf serum. Cells were then transfected with 20 nM SOS1 siRNA, using the Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol and with 5 nM AhR siRNA using the HiPerfect transfection reagent (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. For SOS1 and AhR experiments, the medium was replaced after 24 h of incubation at 37 °C and cells were treated or not with 25 nM TCDD. RNA and protein purification were carried out 48 h after the transfection. siRNA references and/or sequences (Qiagen) were

- siSOS1: Hs_SOS1_5_HP Validated siRNA (ref: SI02655121)
- siAhR: Hs_AHR_5_HP Validated siRNA (ref: SI02780148)
- siControl: GFP Custom siRNA (ref: 1027020)

2.7. Reporter assays

pGLuc basic vector (New England Biolabs, Ipswich, MA) was digested with BglII and HindIII restriction enzymes (New England Biolabs). For the construction of the SOS1 promoter (AF 106953) the –2200, +37 region; (+ 1 refers to the translation start site) was amplified using the following primers: –2200 5'-CTTAGATC-TAAGTGGGGAGTTTTCAAATGT-3' –2170 and +37 5'-AAGCTTTCG-CTGAAAACTCGTAGGG-3' +17. The PCR product was cut with the same restriction enzymes. Transfection experiments were performed as described in siRNA transfection paragraph, using 1 μ g of plasmid. The empty pGLuc basic vector (New England Biolabs) was used as transfection control. Twenty-four hours after the transfection, 50 μ L supernatant (containing the secreted luciferase) were collected and the medium was changed. The cells were then treated or not with 25 nM TCDD as described above. The supernatant was then harvested at 0, 6, 24 and 48 h after TCDD treatment. A luciferase assay (Gaussia) was performed with a New England Biolabs kit (E3300L) and a luminometer (Lumat LB9507, Berthold, Thoiry, France).

2.8. Chromatin immunoprecipitation

HepG2 cells were seeded into 150-mm-diameter dishes (approximately 20×10^6 cells per dish) 48 h before being pro-

cessed for ChIP as previously described [17]. Treatment with TCDD (25 nM) was performed, as described above, for 15- and for 45 min. We used a ChIP-grade antibody from BioMol (anti-AhR antibody, Cat SA-210, BioMol, Plymouth Meeting, Pennsylvania, USA) ChIP DNA was analysed by quantitative PCR using the specific primers covering the region between –984 and –801 bp of the human Sos1 promoter region (forward primer: 5'-GGTTTCGTGACAGACACCT-3' and reverse primer 5'-TAAAGAGGCTCCCCATTGTG 3') and non-specific primers (forward primer: 5'-TGGGGTAGACTGTGGCAGA-3' and reverse primer 5'-GGCTAAGGATTACAGCAGCA-3').

2.9. Ras activity

On day 1, cells were seeded at approximately 15 million cells per 175-cm² plate. Twenty-four hours later (day 2), the medium was changed and siRNA SOS1 transfection was performed (see above). On Day 3, the medium was changed and TCDD (25 nM) was added as previously described. On day 4, the medium was replaced with a medium without serum containing or not TCDD (25 nM). On day 5, cells were lysed in Magnesium Lysis Buffer (MLB, Upstate) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma). Equal amounts of total protein extracts, treated or not, were incubated with Raf-RBD GST beads (Cytoskeleton, Le Perray en Yvelines, France RF-02A), to retain only the active form of Ras, (Ras-GTP) following the manufacturer's recommendations (Upstate). The recovered proteins were separated by SDS-PAGE (see above) and western blots (Ras antibody) were performed. Moreover, we used GTP gamma-S as a positive control and GDP as a negative control (Upstate).

2.10. Cell growth

On day 1, cells were seeded at 30,000 cells/well (in 6-well plates) in complete DMEM medium (see above). On day 4, siRNA SOS1 and siRNA AhR transfection was performed (see above). On day 5, cells were treated with TCDD (25 nM) as above. For each condition, the number of cells per well was counted at times corresponding to 0, 24 and 48 h of TCDD treatment. For cell counting, cells in each well were trypsinised with 150 μ L of Trypsine-Versene (Invitrogen), which was neutralized, with 150 μ L of complete medium.

2.11. Statistical analysis

The data result from at least three independent experiments. The results were expressed as the mean \pm standard error. Differences between groups were analyzed by *U* Mann–Whitney's test (nonparametric comparison of 2 independent series) or *H* Kruskal–Wallis's test (nonparametric comparison of k independent series) followed by a 1-factor ANOVA test (parametric comparison of k independent series). A p-value < 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

TCDD is known to promote cellular proliferation and cell cycle progression in different cellular models. Since several toxicogenomic large-scale studies, including our own, were performed in the human hepatocarcinoma HepG2 cell line and since this cell line exhibits high levels of AhR expression, we used the HepG2 cells for our gene regulation studies. As will be shown later in this article, TCDD elicited a 20% increase in the number of cells during the exponential phase of growth. Thus, the HepG2 cells constitute an appropriate model to investigate the molecular mechanisms of TCDD-elicited cellular proliferation.

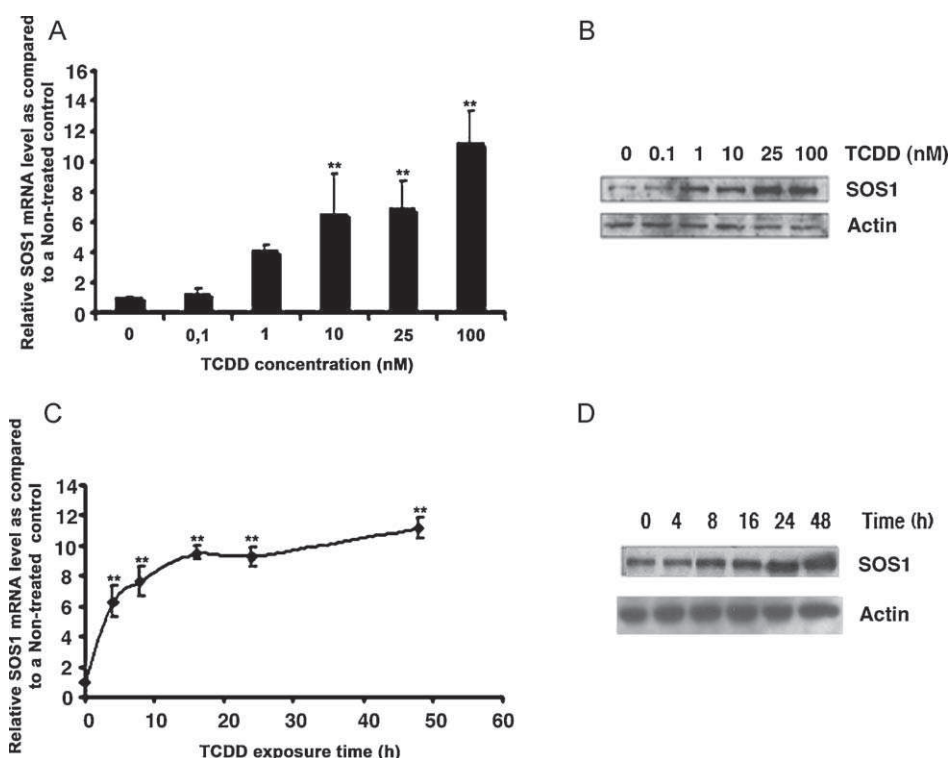


Fig. 1. SOS1 is a target of TCDD in human hepatocarcinoma HepG2 cells. (A) Quantitative real-time PCR (A, C) and western blot analysis (B, D) of SOS1 mRNA and protein levels as a function of TCDD concentration (0–100 nM, 48 h) (A and B) and as a function of time (0–48 h, 25 nM TCDD) (C and D) in human hepatocarcinoma HepG2 cells. Relative mRNA levels were calculated using controls values (0 nM for A or 0 h for C) as references. Actin was used as a loading control for western blots. **, $p < 0.01$ as compared to non-treated controls ($n > 3$).

3.1. Effect of dioxin treatment on SOS1 mRNA and protein levels in HepG2 cells

In a large-scale gene expression study, SOS1 mRNA was found to be induced by TCDD [18]. First, we validated those observations in HepG2 cells. We performed kinetic and dose–response experiments and we extracted both total RNA and total protein. SOS1 expression was assessed using both quantitative real-time PCR (Fig. 1A and C) and immunoblotting (western blots) (Fig. 1B and D). Dose–response experiments showed that TCDD up-regulated SOS1 mRNA expression (Fig. 1A) and protein level (Fig. 1B and Supplementary Fig. 1A). The response was significant for concentrations higher than 10 nM TCDD. Consequently, 25 nM TCDD was used in the following experiments. This concentration of TCDD is within the usual concentration range used to treat human cells (5–100 nM). Fig. 1C and D and Supplementary Fig. 1B show that SOS1 was significantly up-regulated by 25 nM TCDD in a time-dependent manner. In addition to HepG2 cells, we have also observed a significant up-regulation of SOS1 mRNA in several mouse tissues (C57/Bl6) following TCDD treatment (Supplementary Fig. 2). These results indicate that SOS1 is up-regulated upon TCDD treatment and suggest that the SOS1 gene might be an AhR transcriptional target.

3.2. SOS1 mRNA and protein induction is AhR-dependent

We examined the contribution of the Ah Receptor using different AhR ligands including TCDD, Benzo(a)pyrene and quercetin (Fig. 2A) and a RNA interference knock down strategy (Fig. 2B–D). Fig. 2A shows that the AhR ligands, 25 nM TCDD and 5 μ M BaP, significantly increased SOS1 mRNA; although an increase in SOS1 mRNA was also observed after treatment of cells with 25 μ M Quercetin, this increase was not significant. We then knocked down AhR expression using specific siRNA (Fig. 2B),

which decreased AhR mRNA by approximately 60–70% (Fig. 2B). AhR levels remain knock-downed throughout the time course of the experiment (Supplementary Fig. 3). Fig. 2C and D shows that AhR siRNA treatment elicited a statistically significant 50% decrease in both SOS1 mRNA and protein induction by TCDD. In this experiment, we did not expect to completely knock-down AhR levels but we aimed to correlate the relationship between both AhR and SOS1 levels; we observed such a correlation (AhR by the time of treatment, 0 h, 50% decreased levels and SOS1 at the end of the experiment, 50% decrease) and also a 60% decrease in CYP1A1 induction which is classically measured to prove AhR activation (data not shown). These experiments demonstrate that the activated AhR regulates SOS1 mRNA and protein levels.

3.3. The SOS1 gene promoter is a direct target of the AhR

To further characterize the mechanism of SOS1 induction by TCDD, we blocked RNA polymerase II with DRB and measured SOS1 mRNA levels upon TCDD treatment, as well as under untreated conditions. Fig. 3 shows that the rate of SOS1 mRNA decline was not significantly different in treated and untreated conditions suggesting that a decreased rate of SOS1 mRNA degradation is not involved in the TCDD up-regulation of SOS1 mRNA (Fig. 3A). Very recently, the exon–intron structure of the SOS1 gene was displayed in the Pubmed Ace View Database. Exon 1 is shown to start 280 bases upstream of the translation start site for the longest variant. Other mRNA variants differing in the length of the 5' ends have been found in different tissues but little information was given on their abundance. To further define the length of the 5' UTR in our cell line model, we performed a primer extension study, which confirmed the presence of a major start site approximately 150 bp upstream from the translation start site, which is in line with the displayed gene structure (data not shown). A minor transcription start site was also observed downstream from the major one,

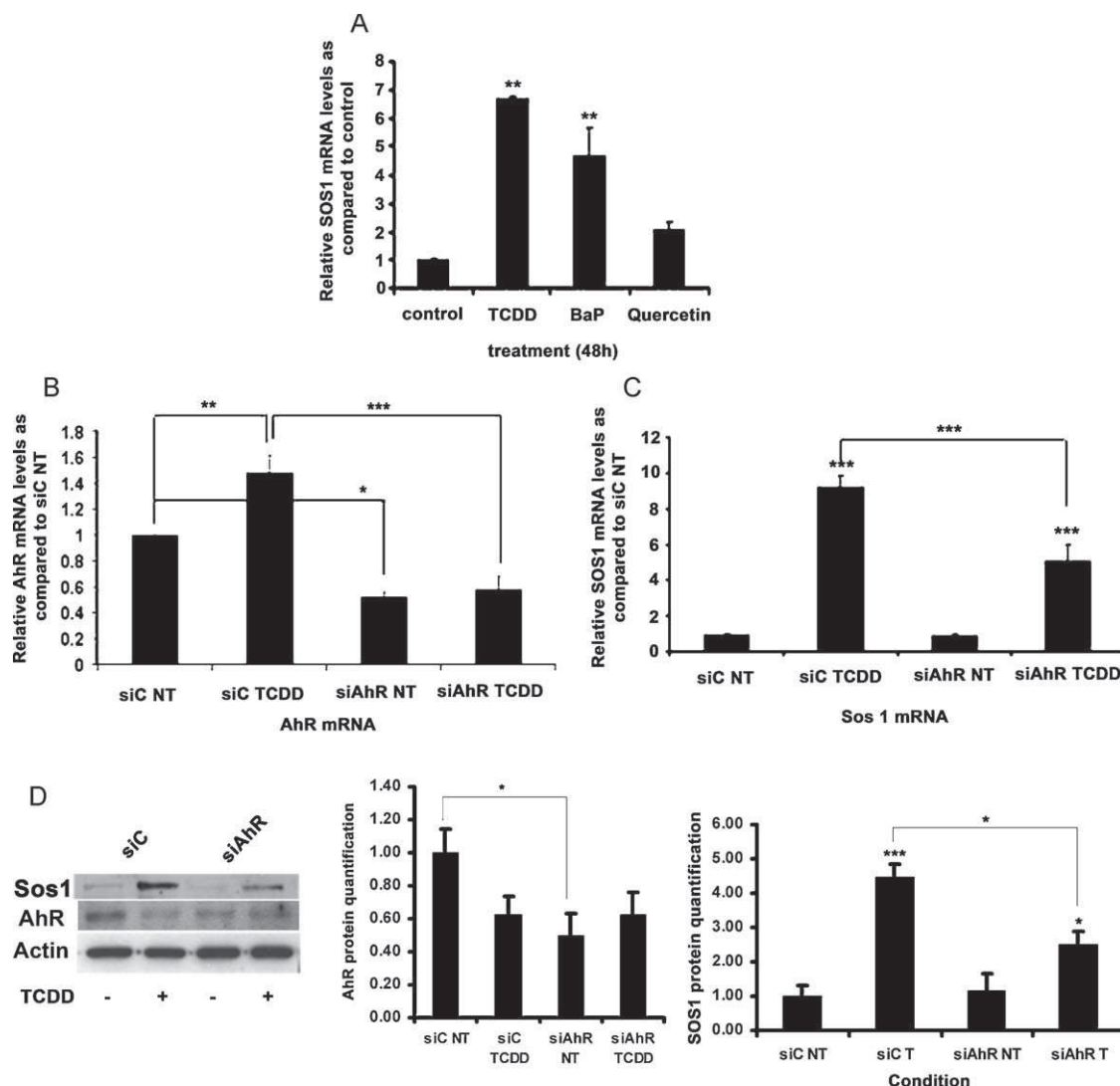


Fig. 2. Involvement of the AhR in the regulation of SOS1 mRNA and protein expression in HepG2 cells. (A) SOS1 mRNA levels measured by quantitative real-time PCR after 48 h-treatment of HepG2 cells with various AhR ligands (TCDD, 25 nM; Benzo(a)pyrene or BaP, 5 μ M; Quercetin, 25 μ M). Relative mRNA levels were calculated using control value as reference (B) AhR mRNA levels measured by quantitative real-time PCR in AhR (siAhR) or control (siC) siRNA-transfected HepG2 cells (NT: non-treated; TCDD: TCDD-treated). (C) SOS1 mRNA levels measured by quantitative real-time PCR in AhR (siAhR) or control (siC) siRNA-transfected HepG2 cells (NT: non-treated; TCDD: TCDD-treated). (A, B, C: ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$ and *, $p < 0.05$ compared to controls ($n > 3$)). (D) Western blot analysis and relative quantification of SOS1 and AhR protein levels in AhR (siAhR) or Control (siC) siRNA-transfected HepG2 cells upon TCDD (+) treatment. Actin was used as a loading control for western blots ($n = 3$).

which is not surprising in this GC-rich promoter. Then we performed a MatInspector[®] analysis of the 2200 base pairs located upstream of the transcription start sites to identify consensus AhR sequences (Xenobiotic Responsive Elements or XRE); Fig. 3B shows the positions and the sequences of 2 putative XREs (AhR binding).

Several experiments were carried out in order to determine whether the SOS1 gene promoter is a direct target of the AhR, including luciferase reporter gene assays (Fig. 4A and B) and Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using a specific AhR antibody (Fig. 4C). We subcloned the (–2200/+37) fragment of the SOS1 gene promoter (which includes the two putative XREs) upstream of the Gaussia luciferase reporter gene. The activity of this gene product can be readily monitored in the medium. Following transfection with this recombinant reporter gene plasmid, HepG2 cells were treated with TCDD and the medium was recovered at different time points for luciferase assay (Fig. 4A). A significant increase in luciferase activity can be observed 24 and 48 h following TCDD treatment. These experiments confirm that the (–2200/+37) SOS1 gene fragment exhibits promoter activity as compared to the empty vector (Fig. 4B), and

suggest that this gene promoter fragment mediates part of the inducing effect of TCDD. Similar experiments were performed in control siRNA and AhR-siRNA treated cells (Fig. 4B). We observed a similar 2- to 3-fold increase in the activity of the SOS1 gene promoter in siControl-transfected cells upon TCDD treatment. However, basal and induced SOS1 promoter activities were significantly reduced in AhR-depleted cells suggesting a contribution of this receptor to SOS1 gene promoter activation.

Finally, we performed a Chromatin immunoprecipitation experiment using a SOS1 promoter fragment (–984/–801) to confirm the direct binding of AhR to the endogenous SOS1 gene promoter (Fig. 4C). AhR antibody and real-time PCR were used to provide a quantitative measurement of receptor binding. Cells were treated for 15 and 45 min with TCDD. Several controls were used for the experiments (inputs, mock antibody). We observed a time-dependent, specific and potent increase of AhR binding to the SOS1 gene promoter. Altogether, these experiments clearly show that the TCDD-mediated transcriptional regulation of the SOS1 gene is related to the rapid direct binding of the AhR to the promoter.

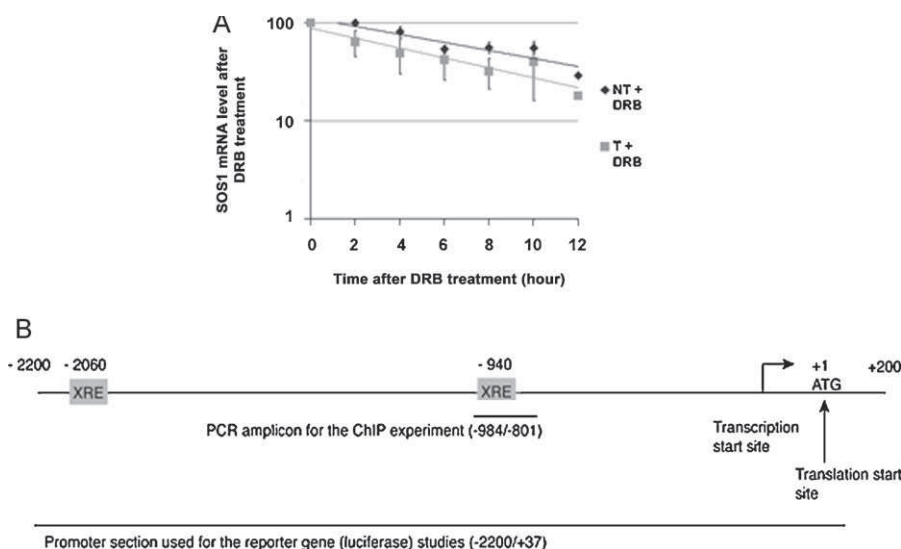


Fig. 3. The AhR dependent-SOS1 regulation is transcriptional. (A) SOS1 mRNA levels measured by relative quantitative real-time PCR in the presence of DRB, an inhibitor of RNA polymerase II in non-treated (NT + DRB) and TCDD-treated (T + DRB) HepG2 cells. Cells were treated or not with 25 nM TCDD for 16 h then with DRB and subsequently harvested (between 0 and 12 h). We use a semi-logarithmic representation. (B) Diagram of the SOS1 promoter (–2200/+37) using the translation start site as reference (+1). Localizations of both XRE consensus sites (–940 and –2060 bp) and the promoter section used for the reported gene (luciferase) experiments (see below).

3.4. TCDD stimulates Ras activity and ERK1/2 phosphorylation through induction of SOS1

Since the Guanine nucleotide Exchange Factor SOS1 regulates the Ras-MAPK pathway, we hypothesized that increased amounts of SOS1 could lead to the activation of this pathway. Thus, we monitored Ras activity (the active GTP-bound form) and ERK phosphorylation following TCDD treatment of HepG2 cells. To monitor Ras activity, we performed affinity pull-down experiments. Beads grafted with the domain of Raf, which specifically interacts with the GTP-bound form of Ras were mixed with different cellular extracts. The bound fraction was then eluted and analyzed with a Ras antibody. Fig. 5A shows that the active form of Ras was increased following TCDD treatment. In parallel, the phosphorylated fraction of ERK was also increased by TCDD treatment (Fig. 5B). To assess the implication of SOS1 in these processes, we down-regulated SOS1 expression using a specific siRNA and observed a clear decrease of TCDD-induced Ras-GTP levels as shown in Fig. 5C. SOS1 protein levels remain knocked down throughout the time course of the experiment. These results show that SOS1 is a critical mediator of TCDD-dependent RAS-MAPK pathway activation. Importantly, for the first time, these observations show that increased amounts of SOS1 are sufficient to activate the downstream pathway indicating that, in HepG2 cells, the amount of SOS1 is limiting. It is noteworthy, however, that the Ras pathway activation by TCDD is delayed as compared to the time course of the response which can be traditionally achieved by Tyrosine Kinase receptor activation [19].

3.5. SOS1 and AhR are critical for dioxin-dependent changes in growth

Since the Ras-ERK pathway is implicated in cell growth, we tested the effect of TCDD treatment on HepG2 cells proliferation. As shown in Fig. 6A and B, TCDD elicited a statistically significant 20% increase in cellular growth in the absence or in the presence of a control siRNA. Following the knock down of SOS1 gene expression (Fig. 6A) using two specific siRNAs, the effect of TCDD was completely abolished. A partial decrease in basal cellular proliferation was also noted, which is not surprising given the implication of the SOS1-Ras-ERK pathway in cellular proliferation.

In addition, AhR-specific siRNAs also prevented the TCDD effects (Fig. 6B). We conclude that SOS1 induction plays a critical role in the TCDD-elicited increase in cellular proliferation.

4. Discussion

AhR activation by polyaromatic and polyhalogenated hydrocarbons has traditionally been associated with induced expression of phase I and phase II xenobiotic metabolizing enzymes, which promote the clearance of pollutants and drugs from metazoan organisms [20]. However, recent toxicogenomic studies, as well as knock-out studies in mice, have unveiled new AhR target genes [13,21–23] and suggested novel functions for this receptor including the regulation of cell proliferation and migration. Several large-scale studies in HepG2 cells [21,22,24] indicated that the SOS1 gene could be a target of TCDD. SOS1, a Guanine Exchange Factor, is essential for the activation of the Ras and Rac signaling pathways, which lead to the regulation of some of the most important cellular functions including cell division, differentiation and migration [4]. Despite these critical roles, neither the regulation of SOS1 expression nor the characterization of its gene promoter has been carried out previously. We recently observed that AhR ligands increase HepG2 cell proliferation and hypothesized that increased SOS1 expression might be involved in this biological effect. We first validated our transcriptomic experiments and showed that the AhR and its ligands positively regulate SOS1 gene expression. Then, we characterized and subcloned, for the first time to our knowledge, the human SOS1 gene promoter. We showed that TCDD and other AhR ligands regulate, via transcriptional mechanisms their activities upon AhR activation followed by direct promoter binding of AhR to XRE sites. Interestingly, the level of induction of SOS1 elicited by each ligand is different. This is in line with one of our former studies showing that the transcriptional response of the AhR depends on the nature of its ligand [25] and, more generally, with the SAHRM concept [26]. Finally, we focused on the implications of the regulation of SOS1 expression by environmental pollutants. Using a siRNA strategy, we demonstrated that increased SOS1 expression is directly linked to Ras and ERK activation, which promotes cell division. This study demonstrates that the activation of the Ras-

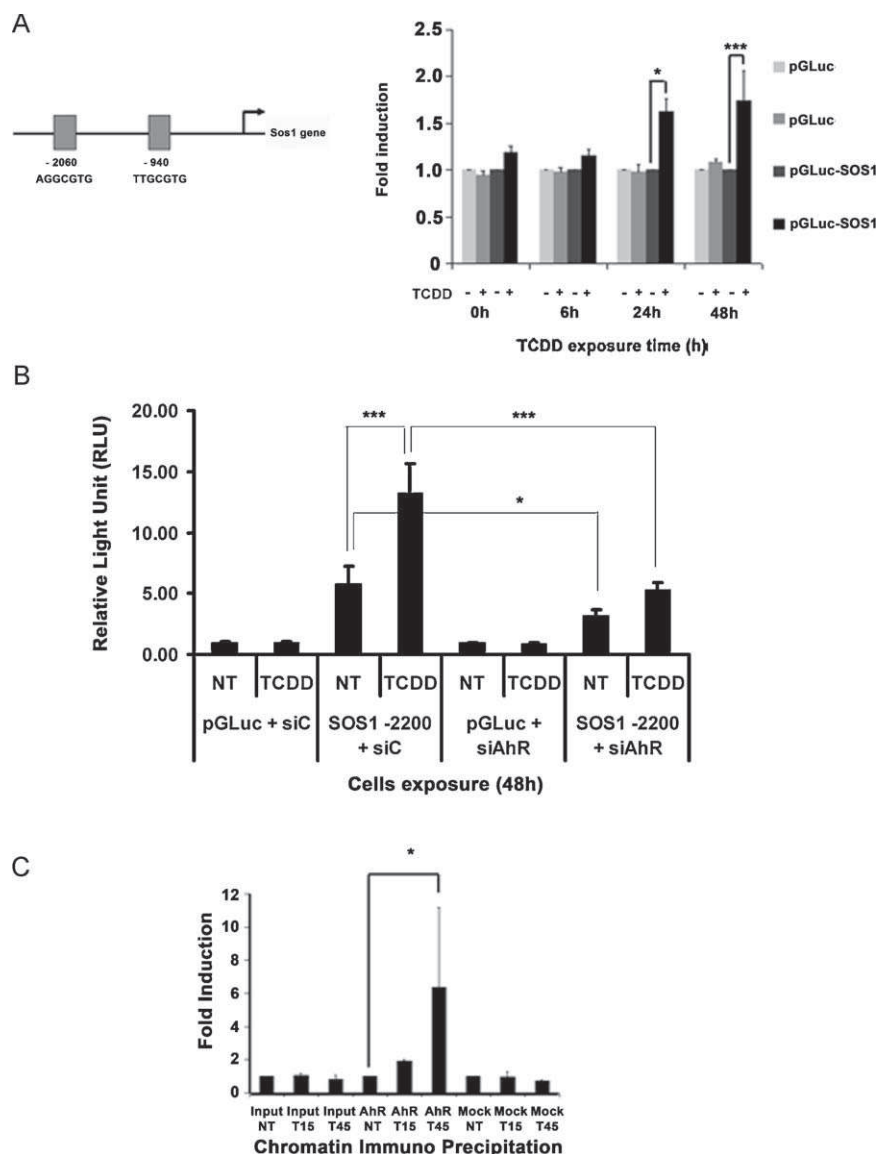


Fig. 4. SOS1 regulation depends on the binding of the AhR to SOS1 promoter. (A) Diagram of the SOS1 promoter subcloned in the Gaussia luciferase basic vector (with both XRE consensus sites at -940 and -2060 bp) and activity of the SOS1 promoter measured after transfection of HepG2 cells with a vector (pGLuc-SOS1) containing the -2200/+37 theoretical promoter region of SOS1 upstream from the Gaussia luciferase reporter gene (+1 refers to the translation start site). The cells were treated (+) or not (-) with TCDD. The medium was sampled after 0, 6, 24 and 48 h. An empty vector (pGLuc) was used as a control. Relative luciferase activities are reported on the y-axis and are calculated using non-treated conditions (-) as control reference for both vectors (B) Activity of the SOS1 promoter measured after transfection of HepG2 cells with a vector (siC) or AhR targeting (siAhR) siRNA and the vector containing the -2200/+37 theoretical promoter region of SOS1 upstream from the Gaussia luciferase reporter gene (pGLuc-SOS1). The cells were treated (+) or not (-) with TCDD for 48 h. The medium was sampled after 48 h. An empty vector (pGLuc) was used as a control. Relative luciferase units (RLU) are reported on the y-axis (C) Chromatin immunoprecipitation performed with a mock or a specific AhR antibody (15 or 45 min of TCDD treatment of HepG2 cells, respectively T15 or T45). Specific primers surrounding the proximal XRE (-940, see Figs. 3 and 4A) of the Sos1 gene promoter were used for the study. Input refers to non-precipitated samples and is used to ensure proper "loading" controls before precipitation. The mock antibody is used to measure unspecific precipitations. Fold induction refers to relative levels calculated using non-treated (NT) conditions as reference. ***, $p < 0.001$ and *, $p < 0.05$ as compared to controls ($n = 3$).

ERK pathway could be achieved by increasing the amount of the SOS1 protein. These results suggest that, under our cell culture conditions, the amount of SOS1 protein is limiting.

The activation of the Ras ERK pathway has been studied extensively in the past and several mechanisms have been reported and characterized [19]. Receptor activation followed by SOS1 recruitment is a classical mechanism under physiological and certain pathological conditions and is one paradigm for cellular signaling [6]. In cancer cells, considerable research has been devoted to the upregulation of this pathway through activating Ras mutations. Similarly, the function of SOS1 has been considerably investigated [27–29]. Recent studies also have correlated SOS1 activating mutations to several diseases of development including

Noonan syndrome, a developmental disorder characterized by short stature, facial dysmorphism, congenital heart defects and skeletal abnormalities [7,8,30] as well as hereditary gingival fibromatosis type 1, a benign overgrowth condition of the gingiva [31]. Despite considerable attention to these gains of function mutations, SOS1 gene regulation has remained poorly characterized [32,33]. We speculate that the findings reported here on the upregulation of SOS1 gene expression by environmental pollutants might constitute one mechanism, which accounts for TCDD and other AhR ligand-mediated carcinogenesis. We expect this effect to be particularly relevant in cancerous cells, which do not exhibit Ras mutations. Indeed, continuous upregulation of SOS1 in these cells may mimic Ras mutational activation and lead to the permanent

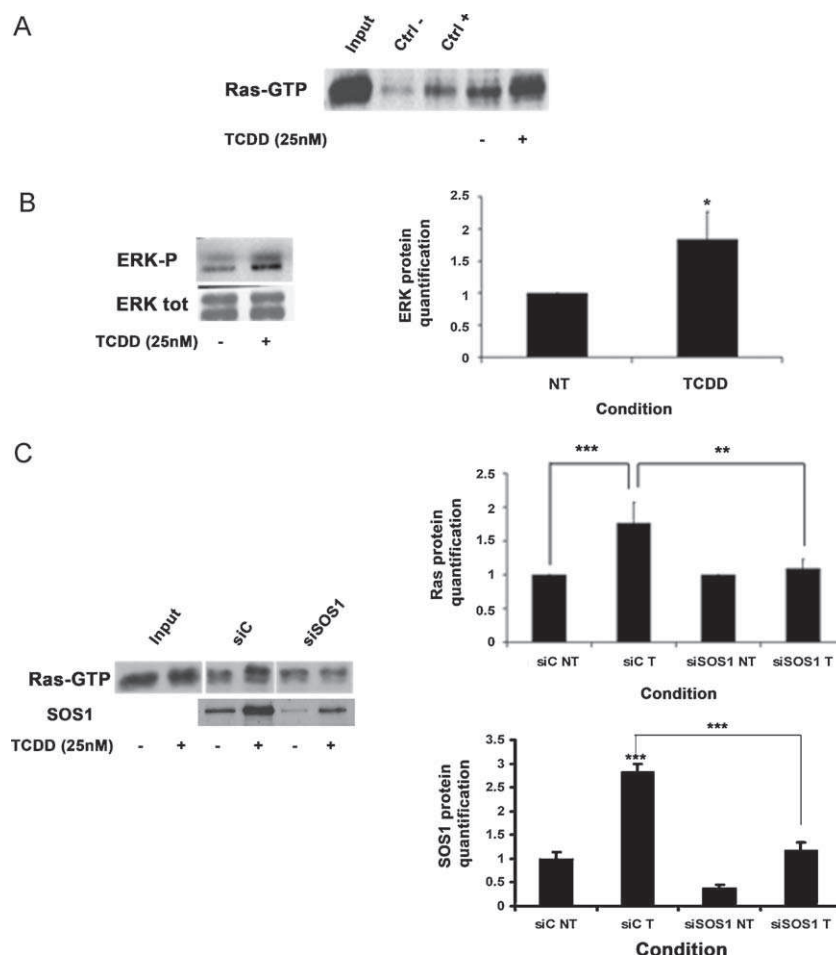


Fig. 5. Increased expression of SOS1 after TCDD treatment stimulates Ras activity and ERK1/2 phosphorylation (A) Western blot analysis of Ras-GTP protein levels after a Ras-GTP specific pull down assay in untreated (–) or 25 nM TCDD-treated (+) HepG2 cells upon 48 h treatment. Input Ras levels show the levels of Ras before precipitation. Precipitation is undertaken using a protein, which specifically interacts with Ras-GTP (Raf), linked to GST-beads. Negative (Ctrl –) and positive (Ctrl +) control respectively refers to extracts over-treated with GDP or GTP-γS before precipitation (see Material and methods for more details). (B) Western blot analysis of phosphorylated ERK levels (ERK-P) in untreated (NT) or TCDD-treated (T) HepG2 cells. Total ERK was used as a loading control. The quantification of three independent experiments is presented in the right panel. Fold induction refers to relative levels calculated using the NT condition as reference. *, $p < 0.05$ compared to controls ($n = 3$). (C) Western blot analysis of Ras-GTP and SOS1 protein levels after Ras-GTP specific pull down assays of untreated (–, NT) or 25 nM TCDD-treated (+, T) HepG2 cells extracts after SOS1 (siSOS1) or control siRNA (siC) transfection. The quantification of three independent experiments is presented in the right panel for both SOS1 and Ras-GTP proteins. Fold induction refers to relative levels calculated using NT conditions as reference. ***, $p < 0.001$ and **, $p < 0.01$ compared to controls ($n = 3$).

stimulation of the downstream signaling pathway, which controls cellular proliferation. Thus, our data imply that increased SOS1 expression may constitute an alternative to the activating mutations of Ras and that it should be relevant to explore and characterize alterations of the expression of this gene in cancer cells [34–36]. Furthermore, it is unclear at this stage whether these two mechanisms can be additive or not. An important question, in this respect, is whether gene induction-mediated chronic activation of the SOS1/Ras pathway can be achieved readily in humans. Because of the high contamination levels and widespread distribution of AhR ligands in our environment, chronic exposure to such pollutants is very common, especially in industrialized countries. In addition, long-term effects could also be triggered by acute high-level exposure to these toxins. Indeed, pollutants such as dioxins tend to resist metabolism and accumulate in human and animal adipose tissue, leading to a permanent internal exposure [37].

Genetic and developmental studies in flies and mice have suggested different and unexpected connections between the AhR and the small G proteins network. A recent study by Carvajal-Gonzalez et al. using AhR KO mice models, has unveiled a link between the receptor and the Vav3, a guanosine diphosphate/guanosine triphosphate exchange factor for Rho/Rac GTPases [38].

Moreover, Son of Sevenless (SOS) has been shown to be a major player in the development of *Drosophila* eye ommatidia. SOS mutations change ommatidia organization and the color perception of the fly [39,40]. Spineless, the *Drosophila* AhR ortholog, is involved in the ommatidial mosaic formation as well as SOS1 [41]. Thus, these two genes converge in the control of eye development. It is tempting to speculate that this genetic interaction may be related to a possible conservation of the control of SOS gene expression by spineless in this invertebrate species. Interestingly, invertebrate AhR orthologs (Spineless and AHR-1 from *Caenorhabditis elegans*) display structural and functional similarities with vertebrate AhR such as transcription factor activity and XRE binding. However, they do not bind dioxins or other hydrocarbon ligands and, at this stage, their possible receptor functions and their activation mechanisms have not been characterized. It is intriguing to consider that, while Spineless and AHR-1 are implicated in fundamental developmental processes, recent *in vivo* and *in vitro* evidences have established direct connections between the mammalian AhR and developmentally relevant pathways such as cellular proliferation, cellular migration and epithelial mesenchymal transition [42,43]. Thus, it is likely that several of those AhR functions including SOS1 regulation, have

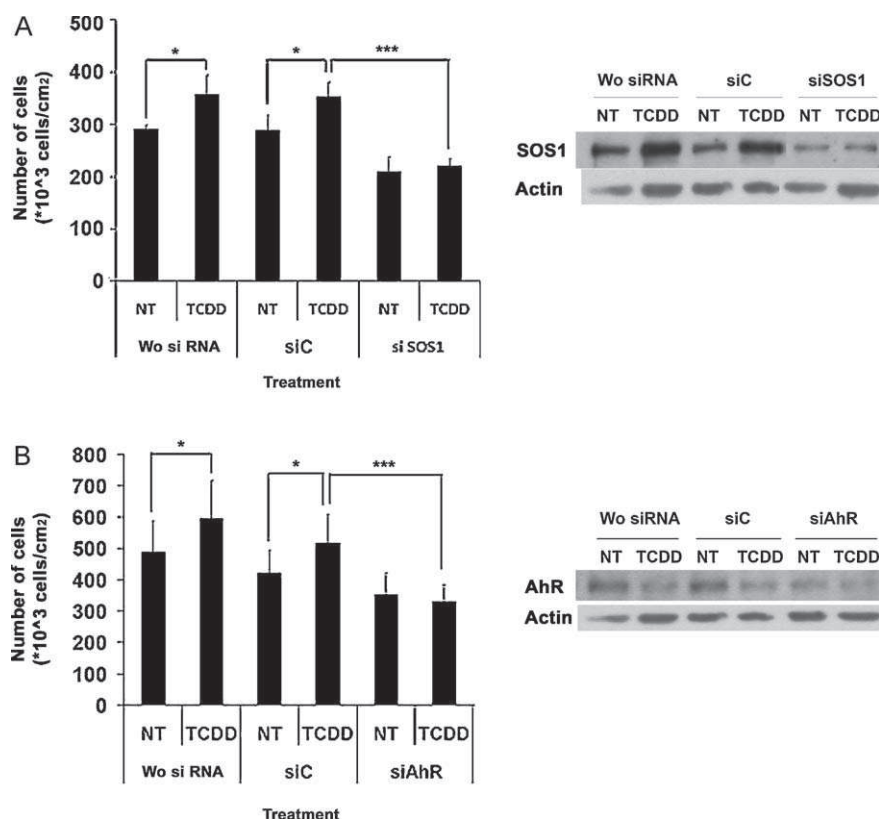


Fig. 6. TCDD-stimulated HepG2 cell growth depends on both AhR expression and increased expression of SOS1. (A) HepG2 cells were either not transfected (wo si RNA) or transfected with control siRNA (siC) or SOS1 siRNA (siSOS1). One day after, they were treated (T) or not (NT) with 25 nM TCDD for 24 h. Cell numbers, expressed in $\times 10^3$ cells/cm², were quantified for each condition. In the right panel of the figure, a western blot-analysis of SOS1 protein levels is presented. (B) HepG2 cells were either not transfected (wo si RNA) or transfected with siControl (siC) or siAhR (siAhR). They were treated (T) or not (NT) with 25 nM TCDD for 48 h. Cell numbers, expressed in $\times 10^3$ cells/cm², were quantified for each condition. In the right panel of the figure, a western blot-analysis of AhR protein levels is presented. *, $p < 0.05$ compared to controls ($n = 3$).

been conserved through evolution and the present study as well as several others suggest that one mechanism of pollutants toxicity would be to disrupt such basic developmental functions of this receptor.

Conflict of interest statement

All authors disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three (3) years of beginning the work submitted.

Acknowledgements

This work was supported by AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail; all authors); the ANR (Agence Nationale de la Recherche, 06SEST26, Oncopop; all authors); ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer, 3927; all authors); the CNRS (Centre Nationale de la recherche scientifique Martine Aggerbeck); the Fondation pour la Recherche Médicale (Bourse post-doctorale, Linh-Chi Bui); INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; all authors); the Ligue contre le Cancer (Bourse post-doctorale, Linh-Chi Bui); the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (Bourse doctorale, Aline Chevallier, Ariane Ambolet-Camoit); the Région Ile de France (bourse doctorale, Stéphane Pierre); the Université Paris Descartes. We thank Dr Lawrence Aggerbeck for his critical reading of this manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bcp.2010.10.003.

References

- [1] Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:517–31.
- [2] Gibbs JB, Sigal IS, Poe M, Scolnick EM. Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:5704–8.
- [3] Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, Perucho M, Li Y, Kamata T, et al. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:2112–6.
- [4] Innocenti M, Tenca P, Frittoli E, Faretta M, Tocchetti A, Di Fiore PP, et al. Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac. *J Cell Biol* 2002;156:125–36.
- [5] McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 2007;26:3113–21.
- [6] Nimnual A, Bar-Sagi D. The two hats of SOS. *Sci STKE* 2002;2002:pe36.
- [7] Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007;39:70–4.
- [8] Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007;39:75–9.
- [9] Steenland K, Bertazzi P, Baccarelli A, Kogevinas M. Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environ Health Perspect* 2004;112:1265–8.
- [10] Okey AB. An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: the Deichmann lecture. *International Congress of Toxicology-XI. Toxicol Sci* 2007;98:5–38.
- [11] Fukunaga BN, Probst MR, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 1995;270:29270–8.

- [12] Rowlands JC, Gustafsson JA. Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* 1997;27:109–34.
- [13] Weiss C, Faust D, Durk H, Kolluri SK, Pelzer A, Schneider S, et al. TCDD induces c-jun expression via a novel Ah (dioxin) receptor-mediated p38-MAPK-dependent pathway. *Oncogene* 2005;24:4975–83.
- [14] Connor KT, Aylward LL. Human response to dioxin: aryl hydrocarbon receptor (AhR) molecular structure, function, and dose–response data for enzyme induction indicate an impaired human AhR. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2006;9:147–71.
- [15] Fernandez-Salguero PM, Ward JM, Sundberg JP, Gonzalez FJ. Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol* 1997;34:605–14.
- [16] Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos* 1998;26:1194–8.
- [17] Bui LC, Tomkiewicz C, Chevallier A, Pierre S, Bats AS, Mota S, et al. Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity. *Oncogene* 2009.
- [18] Puga A, Maier A, Medvedovic M. The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1129–42.
- [19] Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2707–19.
- [20] Schwanekamp JA, Sartor MA, Karyala S, Halbleib D, Medvedovic M, Tomlinson CR. Genome-wide analyses show that nuclear and cytoplasmic RNA levels are differentially affected by dioxin. *Biochim Biophys Acta* 2006;1759:388–402.
- [21] Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock Jr JP. Use of cDNA microarrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression. *Toxicol Lett* 2001;122:189–203.
- [22] Marchand A, Tomkiewicz C, Marchandeanu JP, Boitier E, Barouki R, Garlatti M. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression and counteracts the negative effect of insulin. *Mol Pharmacol* 2005;67:444–52.
- [23] Gomez-Duran A, Carvajal-Gonzalez JM, Mulero-Navarro S, Santiago-Josefat B, Puga A, Fernandez-Salguero PM. Fitting a xenobiotic receptor into cell homeostasis: how the dioxin receptor interacts with TGFbeta signaling. *Biochem Pharmacol* 2009;77:700–12.
- [24] Park R, Kim DH, Kim MS, So HS, Chung HT, Kwon KB, et al. Association of Shc, Cbl, Grb2, and Sos following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in primary rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:577–81.
- [25] Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 2004;24:5209–22.
- [26] Safe S. 3-methylcholanthrene induces differential recruitment of aryl hydrocarbon receptor to human promoters. *Toxicol Sci* 2010;117:1–3.
- [27] Margarit SM, Sondermann H, Hall BE, Nagar B, Hoelz A, Pirruccello M, et al. Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* 2003;112:685–95.
- [28] Sondermann H, Soisson SM, Boykevich S, Yang SS, Bar-Sagi D, Kuriyan J. Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless. *Cell* 2004;119:393–405.
- [29] Zarich N, Oliva JL, Martinez N, Jorge R, Ballester A, Gutierrez-Eisman S, et al. Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1. *Mol Biol Cell* 2006;17:3591–7.
- [30] Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, Sakurai M, Cave H, Verloes A, et al. Clinical manifestations in patients with SOS1 mutations range from Noonan syndrome to CFC syndrome. *J Hum Genet* 2008;53:834–41.
- [31] DeAngelo S, Murphy J, Claman L, Kalmar J, Leblebicioglu B. Hereditary gingival fibromatosis—a review. *Compend Contin Educ Dent* 2007;28(44):52. 138–43; quiz.
- [32] Findlay GM, Pawson T. How is SOS activated? Let us count the ways. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:538–40.
- [33] Quilliam LA. New insights into the mechanisms of SOS activation. *Sci STKE* 2007;2007:pe67.
- [34] Watanabe T, Shinohara N, Moriya K, Sazawa A, Kobayashi Y, Ogiso Y, et al. Significance of the Grb2 and son of sevenless (Sos) proteins in human bladder cancer cell lines. *IUBMB Life* 2000;49:317–20.
- [35] Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, Saijo N, Nishio K. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. *Int J Cancer* 2005;116:36–44.
- [36] Feller SM, Tuchscherer G, Voss J. High affinity molecules disrupting GRB2 protein complexes as a therapeutic strategy for chronic myelogenous leukaemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44:411–27.
- [37] Baccarelli A, Pesatori AC, Masten SA, Patterson Jr DG, Needham LL, Mocarelli P, et al. Aryl-hydrocarbon receptor-dependent pathway and toxic effects of TCDD in humans: a population-based study in Seveso, Italy. *Toxicol Lett* 2004;149:287–93.
- [38] Carvajal-Gonzalez JM, Mulero-Navarro S, Roman AC, Sauzeau V, Merino JM, Bustelo XR, et al. The dioxin receptor regulates the constitutive expression of the vav3 proto-oncogene and modulates cell shape and adhesion. *Mol Biol Cell* 2009;20:1715–27.
- [39] Rogge RD, Karlovich CA, Banerjee U. Genetic dissection of a neurodevelopmental pathway: Son of sevenless functions downstream of the sevenless and EGF receptor tyrosine kinases. *Cell* 1991;64:39–48.
- [40] Bonfini L, Karlovich CA, Dasgupta C, Banerjee U. The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras. *Science* 1992;255:603–6.
- [41] Wernet MF, Mazzoni EO, Celik A, Duncan DM, Duncan I, Desplan C. Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic for colour vision. *Nature* 2006;440:174–80.
- [42] Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett* 2007;581:3608–15.
- [43] Diry M, Tomkiewicz C, Koehle C, Coumoul X, Bock KW, Barouki R, et al. Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene* 2006.

Conclusion et discussion générale

Mes travaux de thèse avaient pour objectifs :

- i) de caractériser le(s) rôle(s) physiologique(s) du AhR dans le système nerveux et d'identifier les nouvelles cibles transcriptionnelles de ce récepteur.
- ii) de déterminer les effets perturbateurs d'un ligand exogène du AhR sur les fonctions physiologiques dans différents tissus comme le cerveau et le foie.

Le AhR joue un rôle physiologique dans le système nerveux des souris C57BL/6J

Dans une première étude, nous avons démontré que les souris AhR^{-/-} possèdent une instabilité oculaire caractérisée par des mouvements pendulaires horizontaux. Ce nystagmus n'a pas pour origine des déficits vestibulaires, ni cérébelleux comme a montré l'étude du réflexe vestibulo-oculaire et de l'adaptation de ce réflexe. En revanche, le réflexe optocinétique est fortement affecté chez ces souris invalidées pour le AhR, suggérant un défaut du système visuo-moteur. Néanmoins, les mécanismes responsables de l'apparition de cette instabilité oculaire restent à élucider. Afin de compléter cette étude, la caractérisation de l'innervation et de la morphologie des muscles extra-oculaires devra être entreprise. L'analyse des plaques motrices des muscles oculomoteurs nous renseignera sur d'éventuels défauts de transmission de l'influx nerveux. De plus, pour visualiser les motoneurones des nerfs oculomoteurs (nerfs crâniens III, IV et VI), les souris AhR^{-/-} seront croisées avec les souris Hb9-GFP (Hb9 est un marqueur des motoneurones). Plus en amont, les propriétés électrophysiologiques des neurones des noyaux oculomoteurs ainsi que des noyaux du système optique accessoire et du tractus optique seront étudiées. Les résultats d'hybridation *in situ* montrent que le AhR est exprimé transitoirement dans les cellules ganglionnaires de la rétine chez les embryons âgés de 14 jours. Les nystagmus congénitaux sont souvent la cause de déficits visuels. Une pathologie, l'amaurose congénitale de Leber, se caractérise par un nystagmus pendulaire et une perte des photorécepteurs rétiniens. Une des mutations responsable de cette maladie est localisée dans le gène codant la protéine AIPL1 (« AhR interacting protein like-1»). Chez l'Homme, cette protéine partage 49% de similarité avec AIP, protéine chaperonne intervenant dans la voie de signalisation du AhR (Van Der Spuy & Cheetham, 2004). AIPL1 est exprimé dans les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) durant le développement embryonnaire et son expression est sélective des cônes à l'âge adulte. Sa fonction moléculaire n'est pas encore très bien connue mais les souris AIPL1^{-/-} présentent une dégénérescence complète des cônes et des bâtonnets à l'âge de 4 semaines (Dyer *et al.*, 2004,

Kirschman *et al.*, 2010). Bien qu'aucune étude n'est démontrée encore l'interaction entre AIPL1 et le AhR, nous avons émis l'hypothèse que les souris AhR^{-/-} pourraient souffrir d'une forme de cette pathologie. Chez les souris adultes, il n'y a pas de différences de morphologie au niveau de la rétine des souris AhR^{-/-}. La quantification de certaines cellules de la rétine (cellules ganglionnaires, amacrines, horizontales, bipolaires, photorécepteurs) n'est pas significativement différente entre les souris AhR^{-/-} et AhR^{+/+}. Des électrorétinogrammes (scotopique et photopique) ont été réalisés chez les souris AhR^{-/-} afin d'enregistrer la réponse électriques des différents types cellulaire de la rétine. Nous n'avons observé aucune différence entre souris sauvages et déficientes en AhR.

Il n'existe, à ce jour, que deux modèles de nystagmus congénital : le chien de berger belge et le poisson zèbre belladonna, animaux achromatiques c'est à dire sans chiasma optique.

Le premier modèle animal est le chien de berger belge achromatique. Ces chiens présentent une absence totale de croisement de leurs nerfs optiques et ont un nystagmus pendulaire horizontal.

Les poissons zèbres achromatiques ont une mutation du gène *belladonna*, homologue du gène murin Lhx2. Contrairement aux poissons zèbres sauvages où la totalité des axones rétino-fuges croisent la ligne médiane, aucun axone des RGC ne croisent chez le poisson Belladonna. Une grande partie des larves (environ 40%) ont des troubles oculomoteurs de type nystagmus pendulaire et/ou à ressort, comparables à la pathologie humaine (Huang *et al.*, 2011). De plus, le réflexe optocinétique de ces poissons est inversé. Cependant, le nystagmus n'est pas observé à l'obscurité contrairement à notre modèle de souris.

Ces deux modèles sont utilisés pour comprendre les mécanismes à l'origine des nystagmus pendulaires congénitaux. Cependant ils présentent de nombreux inconvénients. En effet, de part la difficulté de l'élevage, les chiens ne sont pas des modèles couramment utilisés en science quand au poisson zèbre belladonna, le nystagmus pendulaire n'est pas observé dans l'obscurité. Récemment, les souris albinos ont été proposées comme modèle pour étudier le nystagmus congénital (Traber *et al.*, 2012). En effet, les altérations de la synthèse de mélanine sont liés à des troubles visuels et oculomoteurs.

Le modèle de souris AhR^{-/-} serait alors un bon modèle pour élucider les mécanismes impliqués dans les nystagmus congénitaux. L'élevage des souris AhR^{-/-} n'est toutefois pas aisé (souris fragiles, difficulté de croisement) et la compréhension des mécanismes et tissus à l'origine de la pathologie permettra peut-être à moyen terme, de cibler par recombinaison

homologue spécifique (technologie Cre-LoxP) les tissus qui déterminent les symptômes observés sans les inconvénients liés aux déficits de reproduction.

Le rôle du AhR dans la formation de la gaine de myéline

Les résultats d'hybridation *in situ* chez les embryons montrent également un marquage du AhR autour de nerfs crâniens comme le nerf facial, les branches du ganglion trigéminal ainsi qu'au niveau des ganglions rachidiens. Ces résultats suggèrent que le AhR est exprimé dans les précurseurs des cellules de Schwann (E12 et E14), mais ce résultat reste à confirmer par des co-marquages avec des marqueurs de ces précurseurs. Les cellules de Schwann assurent la myélinisation des axones dans le système nerveux périphérique. Ces cellules dérivent des crêtes neurales, structures formées au dessus du tube neural pendant l'embryogénèse. Les cellules des crêtes neurales acquièrent des propriétés migratoires qui vont leur permettre de se déplacer jusqu'à leur destination finale pour se différencier en mélanocytes, neurones ou cellules de Schwann (Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008). Selon le diamètre de l'axone, les cellules de Schwann seront soit myélinisantes, soit non myélinisantes (figure 43) (Jessen & Mirsky, 2005).

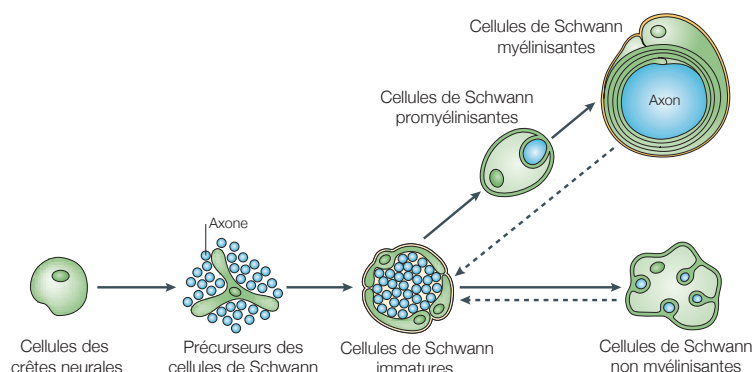


Figure 43 : Illustration schématique des principaux types cellulaires impliqués dans le développement des cellules de Schwann

Les cellules des crêtes neurales migrent et se différencient en précurseur de cellules de Schwann puis en cellules de Schwann immatures. Les cellules de Schwann deviennent soit myélinisantes soit non myélinisantes selon la taille de l'axone qu'elles entourent (Jessen & Mirsky, 2005).

Par ailleurs, des tests comportementaux, qui incluent le test de l'« openfield » et celui du rotarod, montrent que les souris AhR^{-/-} ont des troubles de la locomotion ainsi que de la coordination motrice et de l'apprentissage moteur. Ces résultats suggèrent que les souris AhR^{-/-} pourraient avoir une altération de la gaine de myéline entourant les axones des nerfs périphériques. De plus, de nombreuses maladies qui affectent la myéline du système nerveux

périphérique et/ou central, ont pour symptômes des altérations motrices et sont associées à la présence d'un nystagmus. Parmi ces pathologies, la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type III, est due à une démyélinisation des nerfs périphériques et est caractérisée par des faiblesses dans les membres et un nystagmus. La gaine de myéline des nerfs centraux (nerf optique) et périphériques (nerf sciatique) sera étudiée par microscopie électronique chez les souris invalidées pour le AhR. De plus, nous avons commencé des tests qui permettent de mesurer les capacités physiques des souris AhR^{-/-} :

- i) La nage forcée à contre-courant (collaboration avec l'équipe de F. Charbonnier, CeSEM). Ce test consiste à placer une souris dans une piscine où elle doit nager à contre courant. Il permet de déterminer les capacités physiques des souris qui sont le reflet de la force musculaire des animaux ainsi que leur endurance. Les premiers résultats (n=7 pour chaque groupe) montrent que les souris AhR^{-/-} se fatiguent plus vite et, ainsi, nagent moins longtemps que les souris contrôles.
- ii) Le test d'agrippement ou « Grip Test » (collaboration avec l'équipe de C. Massaad, CeSEM) permet de mesurer la force musculaire des souris. Les premiers résultats ont permis de mettre en évidence une faiblesse musculaire chez les souris AhR^{-/-}.

D'autre part, compte tenu des résultats observés en hybridation *in situ*, les souris AhR KO pourraient souffrir de déficits sensoriels. Le test de la plaque chauffante nous renseignera sur ce sujet.

Le laboratoire souhaiterait dans un futur proche acquérir des souris AhR^{fx}, où l'exon 2 du AhR est entouré deux séquences LoxP permettant ainsi une expression conditionnelle du récepteur (Walisser et al., 2005). Le croisement de ces souris avec des animaux porteurs d'une construction CRE spécifique des types cellulaires d'intérêts, nous permettra d'identifier les régions clés à l'origine des troubles comportementaux.

Le rôle physiologique du AhR dans le cervelet des souris C57BL/6J

Dans le second article, l'étude transcriptomique globale dans le cervelet de souris adultes, a permis de mettre en évidence :

- De nouveaux gènes régulés par le AhR en l'absence de ligand exogène. De nombreux gènes (2735 gènes) ont une expression modifiée par l'absence du AhR. L'analyse par réseau a mis en évidence une diminution de gènes à « homéobox » ainsi que de gènes impliqués dans la différenciation neuronale.

- De nouveaux gènes régulés par la TCDD. Environ 1000 gènes ont une expression modifiée par un traitement à la dioxine dans les souris AhR^{+/+}. Nous avons observé que certaines catégories de gènes sont augmentées ou diminuées suite à ce traitement par la TCDD mais aussi chez les souris AhR^{-/-}. Ces résultats vont dans le sens de la perturbation, par la TCDD, des fonctions physiologiques du AhR. Ce processus est schématisé dans la figure 44.

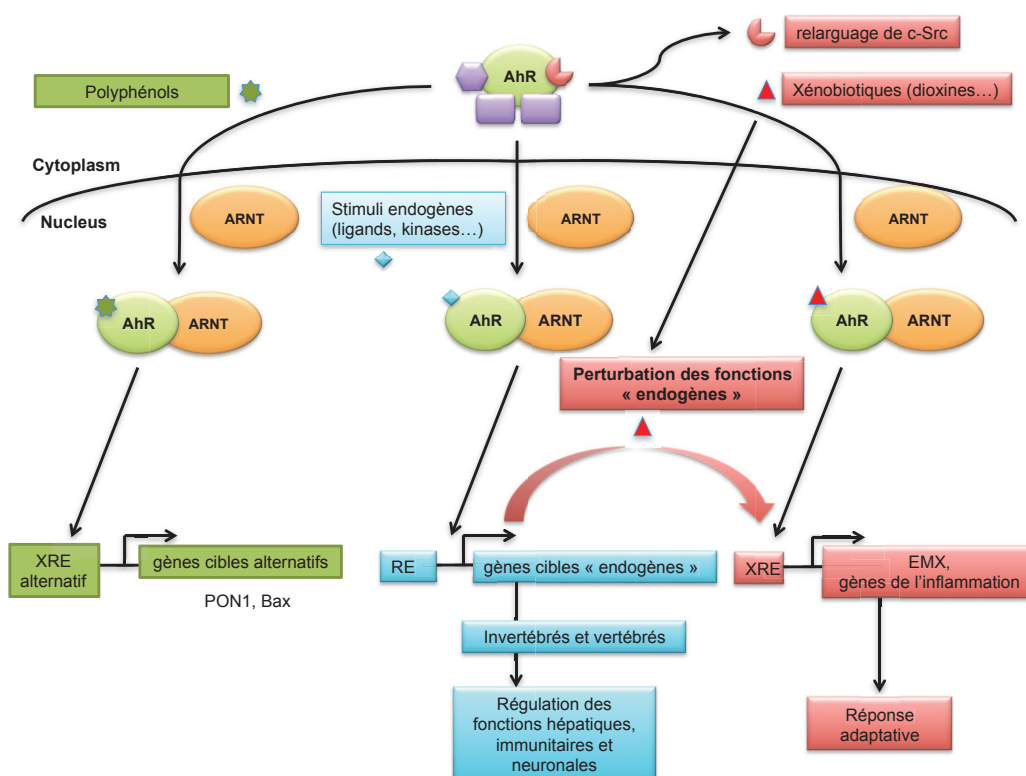


Figure 44 : Les différentes voies d'activation du AhR et les réponses transcriptionnelles associées.

Le AhR est un facteur de transcription complexé à des protéines chaperonnes dans le cytoplasme des cellules. La liaison d'un ligand provoque la translocation nucléaire du AhR et son hétérodimérisation avec un partenaire, l'ARNT. La libération du AhR de son complexe cytoplasmique est aussi associée avec l'activation de la protéine c-Src. La liaison du AhR avec des xénobiotiques (dioxines, ...) entraîne l'induction de la réponse adaptative aux xénobiotiques (à droite de la figure). En parallèle, certains polyphénols ont été décrits comme ligands du AhR mais n'activent que très peu la voie de la réponse adaptative aux xénobiotiques. La quercétine et le resvératrol, deux polyphénols, augmentent l'expression du gène PON1 via le AhR par une voie dite alternative (à gauche de la figure). Finalement, le AhR possède des fonctions physiologiques qui peuvent être induites par un ligand endogène ou d'autres stimulations (phosphorylation, ...). Dans ce modèle, la liaison d'un ligand exogène au AhR peut provoquer la perturbation des fonctions endogènes du AhR (Adapté de la revue acceptée à Drug Discovery & Therapeutics).

Cette étude transcriptomique a été effectuée à partir d'homogénat de cervelets ; nous n'avons donc pas identifié les types cellulaires responsables des modifications d'expression. De plus, les expériences d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie n'ont pas permis de détecter la présence du AhR dans le cervelet des souris. Des expériences de Western Blot réalisées à partir d'homogénat de cervelet n'ont pas révélé la présence du récepteur. Cependant, si on s'appuie sur les données publiées dans la littérature, le AhR est présent spécifiquement dans les cellules granulaires du cervelet chez les souris C57BL/6. De plus, nous observons une augmentation de l'ARNm du Cyp1a1 après traitement par la dioxine dans le cervelet des souris AhR^{+/+}. L'expression de ce gène cible de la dioxine est dépendant du AhR, ce qui suggère que le récepteur est exprimé dans le cervelet malgré l'absence de détection par hybridation *in situ* et Western Blot. Afin d'identifier les cibles cellulaires, l'expression des gènes identifiés lors de cette analyse transcriptomique sera étudiée dans des cultures primaires de cellules granulaires de cervelet.

De plus, cette étude devra être complétée par d'autres expériences de qPCR, Western blot et d'immunohistochimie afin de renforcer ces conclusions. Cependant, ce travail a permis de renforcer notre hypothèse sur la perturbation des fonctions endogènes du AhR par la dioxine et d'ouvrir des perspectives de travail pour mieux comprendre les mécanismes d'action des ligands du AhR.

Parmi les cibles du AhR identifiées lors de cette étude transcriptomique, certains gènes dont Lhx2, Lhx9 et Ngef retiennent tout particulièrement notre attention :

- Les gènes Lhx2 (ou LH2A) et Lhx9 (ou LH2B) appartiennent au groupe des protéines à homéodomaine LIM (LIM-HD) (Hobert & Westphal, 2000). Les protéines à homéodomaine, motif protéique très conservé durant l'évolution, sont des facteurs de transcription qui jouent des rôles majeurs dans la morphogénèse. Lhx2 est exprimé dès le jour 8,5 chez l'embryon de souris. Cette protéine est impliquée dans le guidage des interneurons commisuraux dorsaux ainsi que dans le développement du cerveau antérieur. Les embryons Lhx2^{-/-} sont anophtalmiques (pas de formation de la cupule optique) et présentent une hypoplasie du cortex (Porter *et al.*, 1997). Lhx9 est exprimé à partir du jour 10,5 chez la souris dans le cortex cérébral (hippocampe, neurones de Cjal-Retzius). Il est aussi exprimé dans les membres en développement (Bertuzzi *et al.*, 1999).
- Ngef, également nommé ephéxin, est un facteur d'échange de nucléotides guanine pour les protéines de la famille des RhoGTPase tels que RhoA, Rac1 et cdc 42. Il joue un rôle essentiel dans la maturation et la fonction des jonctions

neuromusculaires chez les mammifères (Shi *et al.*, 2010). Il est également impliqué dans les mécanismes de guidage axonal.

L'expression de ces gènes est diminuée après invalidation du AhR ainsi que lors d'un traitement de souris sauvages par la dioxine. L'implication du AhR dans la régulation de ces gènes sera étudiée. De plus, les conséquences de diminution d'expression de ces gènes pourraient être à l'origine des défauts observés chez les souris AhR^{-/-}.

Les voies de signalisation physiologiques du AhR

L'ensemble de ces études démontre un rôle du AhR dans la mise en place et l'organisation du système nerveux des souris et ce, en l'absence d'une liaison de ce récepteur à des polluants. Ceci soulève légitimement la question de l'identité de la voie de signalisation du AhR chez les vertébrés mais aussi chez les invertébrés comme *Caenorhabditis elegans*, chez lesquels le AhR joue un rôle dans le développement du système nerveux. Plusieurs hypothèses peuvent ainsi être posées:

- Un ligand endogène pourrait activer la voie de signalisation du AhR. Plusieurs ligands sont présents dans le cerveau et possèdent une affinité forte pour ce récepteur (de l'ordre du μM). Par exemple, les produits dérivés du tryptophane telle que la kynurénine (chapitre I.B.5.c.2) y sont produits et peuvent, ainsi lier et activer la voie de signalisation du AhR. Cependant, la plupart de ces ligands ne sont pas stables et sont très vite dégradés. Ces différences de structure et de demi-vie qui caractérisent ces ligands endogènes par rapport aux polluants persistants tels que la TCDD peuvent probablement conduire à des différences notables dans la voie de signalisation activée. Ainsi le laboratoire a déjà mis en évidence que deux ligands de structure différentes n'activent pas les mêmes gènes du fait d'une liaison du AhR à des XRE de séquence alternative (Gouedard *et al.*, 2004). Par ailleurs, les modèles cellulaires utilisés au laboratoire montrent qu'un traitement par la TCDD conduit à une diminution de la quantité de protéine AhR (probablement par un mécanisme de rétrocontrôle impliquant une ubiquitinylation de la protéine) qui pourrait ne pas être observée avec des ligands plus instables comme la kynurénine. Ainsi, les gènes régulés par les ligands endogènes mentionnés pourraient être différents de ceux régulés par les polluants, avec une dynamique de régulation elle aussi différente. De nombreuses recherches devront être menées pour mettre la lumière sur ces zones obscures de la régulation du AhR

qui ont à la fois un intérêt fondamental et en terme de santé publique (car pouvant rendre compte de toxicités en cas de perturbations).

- Le AhR peut également être activé par des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, chapitre I.B.5.d) ce qui rend d'autant plus complexe le système précédemment évoqué.

Effets de la dioxine et d'autres ligands exogènes du AhR sur le comportement des souris

Dans cette étude, nous avons démontré que le AhR était impliqué dans divers rôles physiologiques dans le système nerveux. Toutefois, la principale fonction connue de ce récepteur est la régulation des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Certains ligands exogènes de ce récepteur tels que la TCDD ou le BaP ont été identifiés comme neurotoxiques. Cependant, les mécanismes d'action de ces toxiques sur le système nerveux n'ont pas été clairement identifiés. Nous souhaiterions étudier les effets de ces ligands exogènes sur les défauts de comportements identifiés chez les souris AhR^{-/-}. Des souris AhR^{+/+} gestantes seront traitées avec une dose aiguë (1 injection intra-péritonéale de 25 µg/kg de TCDD au 8^{ème} jour de gestation) ou chronique (gavage 0,2 µg/kg de TCDD du jour 8 de gestation au sevrage des souriceaux). Les tests comportementaux réalisés sur les souris AhR^{-/-} seront reproduits chez ces souris de génération F1 à différents âges. Une précédente étude réalisée chez les rats Wistar traités par de la TCDD durant leur développement montre une diminution du maintien sur le rotarod (Thiel et al., 1994). Notre étude sur les souris AhR^{-/-} montre également un défaut de maintien sur le rotarod. La comparaison entre le phénotype des souris AhR^{+/+} traitées et les souris AhR^{-/-} nous permettra une meilleure compréhension des mécanismes d'actions des polluants environnementaux agissant par la voie du AhR et de mieux appréhender les risques toxicologiques suite à une exposition à ces polluants. En effet, malgré l'émergence de l'idée que certains polluants environnementaux sont impliqués dans le développement de maladies neurodégénératives, les mécanismes d'action des polluants sur le système nerveux sont très peu étudiés.

Effets de la dioxine sur la physiopathologie du foie chez les souris AhR^{-/-}

Dans ce dernier travail, nous avons montré qu'une exposition à la dioxine de souris adultes entraînait l'apparition d'une fibrose hépatique caractérisée par une augmentation des gènes pro-inflammatoires et pro-fibrotiques ainsi qu'une diminution des marqueurs des

cellules épithéliales au profit des marqueurs mésenchymateux. L'induction de la fibrose hépatique serait le résultat d'une transition épithélio-mésenchymateuse de type 2 (Kalluri & Weinberg, 2009). Cette fibrose est également observée dans les modèles de souris AhR^{-/-}.

Cependant, les doses (25 µg/kg) utilisées conduisant aux premiers signes de fibrose visibles en histologie sont relativement élevées. De plus, nous avons travaillé avec des souris C57BL/6J qui possèdent l'allèle AhR^b, c'est à dire le récepteur qui a la plus haute affinité pour la TCDD (K_d=0,27nM). Le traitement de souris AhR^{+/+} avec 10 µg/kg de dioxine conduit également à une induction des gènes pro-inflammatoires et pro-fibrotiques à cette dose après seulement 2 semaines de traitement mais sans modification morphologique apparente. Afin de prolonger ce travail, un traitement avec des doses plus faibles de TCDD (0,1 à 1 µg/kg) sur des périodes plus longues, sera réalisé. Cette exposition sera plus en accord avec les expositions que l'on retrouve chez l'Homme. En effet, malgré la nouvelle réglementation et les interdictions d'emplois de certains composés, l'Homme est continuellement exposé à des polluants environnementaux. De plus, la dioxine et les autres polluants organiques persistants (POP) sont stockés de nombreuses années dans le tissu adipeux chez l'Homme (la demi-vie de la TCDD est de 7 à 9 ans chez l'Homme). Un travail du laboratoire a montré que lors d'un fort amaigrissement, les toxiques stockés dans le tissu adipeux sont libérés dans la circulation sanguine, limitant les effets bénéfiques (principalement métaboliques) de l'amaigrissement (Kim et al., 2011). Les traitements réalisés à de plus faibles doses de TCDD seront également effectués chez des souris obèses ou exposées à l'alcool (deux facteurs favorisant l'apparition d'une fibrose) pour étudier l'influence de la dioxine sur l'amplitude et la vitesse d'apparition de cette pathologie au niveau hépatique. Cette démarche s'inscrit dans l'étude de l'influence de basses concentrations de POPs dans l'apparition de pathologies chroniques et donc dans une démarche de santé publique.

Bibliographie

- Aarnio, V., Storvik, M., Lehtonen, M., Asikainen, S., Reisner, K., Callaway, J., Rudgalvyte, M., Lakso, M. & Wong, G. (2010) Fatty acid composition and gene expression profiles are altered in aryl hydrocarbon receptor-1 mutant *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **151**, 318-324.
- Abbott, B.D., Birnbaum, L.S. & Perdew, G.H. (1995) Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn*, **204**, 133-143.
- Abbott, B.D., Schmid, J.E., Pitt, J.A., Buckalew, A.R., Wood, C.R., Held, G.A. & Diliberto, J.J. (1999) Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*, **155**, 62-70.
- Abbott, N.J., Ronnback, L. & Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 41-53.
- Abel, J. & Haarmann-Stemmann, T. (2010) An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem*, **391**, 1235-1248.
- Ahmed, R.G. (2011) Perinatal TCDD exposure alters developmental neuroendocrine system. *Food Chem Toxicol*, **49**, 1276-1284.
- Akahoshi, E., Yoshimura, S. & Ishihara-Sugano, M. (2006) Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study. *Environ Health*, **5**, 24.
- Akahoshi, E., Yoshimura, S., Uruno, S. & Ishihara-Sugano, M. (2009) Effect of dioxins on regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by aryl hydrocarbon receptor: a neurotoxicology study. *Environ Health*, **8**, 24.
- Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M.L., Pettersson, S., Hanberg, A. & Poellinger, L. (2002) A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9990-9995.
- Andreasen, E.A., Hahn, M.E., Heideman, W., Peterson, R.E. & Tanguay, R.L. (2002) The zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor type 1 is a novel vertebrate receptor. *Mol Pharmacol*, **62**, 234-249.
- Baba, T., Mimura, J., Gradin, K., Kuroiwa, A., Watanabe, T., Matsuda, Y., Inazawa, J., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. (2001) Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem*, **276**, 33101-33110.
- Baba, T., Mimura, J., Nakamura, N., Harada, N., Yamamoto, M., Morohashi, K. & Fujii-Kuriyama, Y. (2005) Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol Cell Biol*, **25**, 10040-10051.
- Backlund, M. & Ingelman-Sundberg, M. (2005) Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Cell Signal*, **17**, 39-48.
- Bacsi, S.G., Reisz-Porszasz, S. & Hankinson, O. (1995) Orientation of the heterodimeric aryl hydrocarbon (dioxin) receptor complex on its asymmetric DNA recognition sequence. *Mol Pharmacol*, **47**, 432-438.
- Bell, D.R. & Poland, A. (2000) Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90. *J Biol Chem*, **275**, 36407-36414.
- Beraneck, M. & Lambert, F.M. (2009) Impaired perception of gravity leads to altered head direction signals: what can we learn from vestibular-deficient mice? *J Neurophysiol*, **102**, 12-14.
- Bertuzzi, S., Porter, F.D., Pitts, A., Kumar, M., Agulnick, A., Wassif, C. & Westphal, H. (1999) Characterization of Lhx9, a novel LIM/homeobox gene expressed by the pioneer neurons in the mouse cerebral cortex. *Mech Dev*, **81**, 193-198.
- Betts-Henderson, J., Bartesaghi, S., Crosier, M., Lindsay, S., Chen, H.L., Salomoni,

- P., Gottlob, I. & Nicotera, P. (2010) The nystagmus-associated FRMD7 gene regulates neuronal outgrowth and development. *Hum Mol Genet*, **19**, 342-351.
- Birnbaum, L.S. & Tuomisto, J. (2000) Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Addit Contam*, **17**, 275-288.
- Boutros, P.C., Bielefeld, K.A., Pohjanvirta, R. & Harper, P.A. (2009) Dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries: comparison of liver and kidney in AHR-null mice. *Toxicol Sci*, **112**, 245-256.
- Bui, L.C., Tomkiewicz, C., Chevallier, A., Pierre, S., Bats, A.S., Mota, S., Raingeaud, J., Pierre, J., Diry, M., Transy, C., Garlatti, M., Barouki, R. & Coumoul, X. (2009) Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity. *Oncogene*, **28**, 3642-3651.
- Burbach, K.M., Poland, A. & Bradfield, C.A. (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8185-8189.
- Butler, R.A., Kelley, M.L., Powell, W.H., Hahn, M.E. & Van Beneden, R.J. (2001) An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. *Gene*, **278**, 223-234.
- Carvajal-Gonzalez, J.M., Mulero-Navarro, S., Roman, A.C., Sauzeau, V., Merino, J.M., Bustelo, X.R. & Fernandez-Salguero, P.M. (2009a) The dioxin receptor regulates the constitutive expression of the vav3 proto-oncogene and modulates cell shape and adhesion. *Mol Biol Cell*, **20**, 1715-1727.
- Carvajal-Gonzalez, J.M., Roman, A.C., Cerezo-Guisado, M.I., Rico-Leo, E.M., Martin-Partido, G. & Fernandez-Salguero, P.M. (2009b) Loss of dioxin-receptor expression accelerates wound healing in vivo by a mechanism involving TGFbeta. *J Cell Sci*, **122**, 1823-1833.
- Carver, L.A. & Bradfield, C.A. (1997) Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem*, **272**, 11452-11456.
- Carver, L.A., LaPres, J.J., Jain, S., Dunham, E.E. & Bradfield, C.A. (1998) Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J Biol Chem*, **273**, 33580-33587.
- Cespedes, M.A., Galindo, M.I. & Couso, J.P. (2010) Dioxin toxicity in vivo results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One*, **5**, e15382.
- Chang, C., Smith, D.R., Prasad, V.S., Sidman, C.L., Nebert, D.W. & Puga, A. (1993) Ten nucleotide differences, five of which cause amino acid changes, are associated with the Ah receptor locus polymorphism of C57BL/6 and DBA/2 mice. *Pharmacogenetics*, **3**, 312-321.
- Chatonnet, F., Picou, F., Fauquier, T. & Flamant, F. (2011) Thyroid hormone action in cerebellum and cerebral cortex development. *J Thyroid Res*, **2011**, 145762.
- Choi, S.S., Witek, R.P., Yang, L., Omenetti, A., Syn, W.K., Moylan, C.A., Jung, Y., Karaca, G.F., Teaberry, V.S., Pereira, T.A., Wang, J., Ren, X.R. & Diehl, A.M. (2010) Activation of Rac1 promotes hedgehog-mediated acquisition of the myofibroblastic phenotype in rat and human hepatic stellate cells. *Hepatology*, **52**, 278-290.
- Cohen, J.S., Gross, R.L., Cheetham, J.K., VanDenburgh, A.M., Bernstein, P. & Whitcup, S.M. (2004) Two-year double-masked comparison of bimatoprost with timolol in patients with glaucoma or ocular hypertension. *Surv Ophthalmol*, **49 Suppl 1**, S45-52.
- Cole, S.W., Galic, Z. & Zack, J.A. (2003) Controlling false-negative errors in microarray differential expression analysis: a PRIM approach. *Bioinformatics*, **19**, 1808-1816.
- Collins, L.L., Williamson, M.A., Thompson, B.D., Dever, D.P., Gasiewicz, T.A. & Opanashuk, L.A. (2008) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure disrupts granule neuron precursor maturation in the developing

- mouse cerebellum. *Toxicol Sci*, **103**, 125-136.
- Corchero, J., Martin-Partido, G., Dallas, S.L. & Fernandez-Salguero, P.M. (2004) Liver portal fibrosis in dioxin receptor-null mice that overexpress the latent transforming growth factor-beta-binding protein-1. *Int J Exp Pathol*, **85**, 295-302.
- Coumoul, X. (2007) [Dioxin and estradiol, a "complex" story]. *Med Sci (Paris)*, **23**, 701-702.
- Dandekar, S.S., Ebenezer, N.D., Grayson, C., Chapple, J.P., Egan, C.A., Holder, G.E., Jenkins, S.A., Fitzke, F.W., Cheetham, M.E., Webster, A.R. & Hardcastle, A.J. (2004) An atypical phenotype of macular and peripapillary retinal atrophy caused by a mutation in the RP2 gene. *Br J Ophthalmol*, **88**, 528-532.
- Dauchy, S., Dutheil, F., Weaver, R.J., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.O., Scherrmann, J.M., De Waziers, I. & Decleves, X. (2008) ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J Neurochem*, **107**, 1518-1528.
- Dauchy, S., Miller, F., Couraud, P.O., Weaver, R.J., Weksler, B., Romero, I.A., Scherrmann, J.M., De Waziers, I. & Decleves, X. (2009) Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol*, **77**, 897-909.
- Davarinos, N.A. & Pollenz, R.S. (1999) Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem*, **274**, 28708-28715.
- Denison, M.S. & Nagy, S.R. (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43**, 309-334.
- Dever, D.P. & Opanashuk, L.A. (2012) The aryl hydrocarbon receptor contributes to the proliferation of human medulloblastoma cells. *Mol Pharmacol*, **81**, 669-678.
- Diry, M., Tomkiewicz, C., Koehle, C., Coumoul, X., Bock, K.W., Barouki, R. & Transy, C. (2006) Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene*, **25**, 5570-5574.
- Dolwick, K.M., Swanson, H.I. & Bradfield, C.A. (1993) In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8566-8570.
- Dougherty, E.J. & Pollenz, R.S. (2008) Analysis of Ah receptor-ARNT and Ah receptor-ARNT2 complexes in vitro and in cell culture. *Toxicol Sci*, **103**, 191-206.
- Duncan, D.M., Burgess, E.A. & Duncan, I. (1998) Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristapedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes Dev*, **12**, 1290-1303.
- Dyer, M.A., Donovan, S.L., Zhang, J., Gray, J., Ortiz, A., Tenney, R., Kong, J., Allikmets, R. & Sohocki, M.M. (2004) Retinal degeneration in Aipl1-deficient mice: a new genetic model of Leber congenital amaurosis. *Brain Res Mol Brain Res*, **132**, 208-220.
- Dzeletovic, N., McGuire, J., Daujat, M., Tholander, J., Ema, M., Fujii-Kuriyama, Y., Bergman, J., Maurel, P. & Poellinger, L. (1997) Regulation of dioxin receptor function by omeprazole. *J Biol Chem*, **272**, 12705-12713.
- Ehrt, O. (2012) Infantile and acquired nystagmus in childhood. *Eur J Paediatr Neurol*, **16**, 567-572.
- Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Ikawa, S. & Fujii-Kuriyama, Y. (1994) Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J Biol Chem*, **269**, 27337-27343.
- Emmons, R.B., Duncan, D., Estes, P.A., Kiefel, P., Mosher, J.T., Sonnenfeld, M., Ward, M.P., Duncan, I. & Crews, S.T. (1999) The spineless-aristapedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila*. *Development*, **126**, 3937-3945.

- Esser, C. (2009) The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. *Biochem Pharmacol*, **77**, 597-607.
- Evans, B.R., Karchner, S.I., Allan, L.L., Pollenz, R.S., Tanguay, R.L., Jenny, M.J., Sherr, D.H. & Hahn, M.E. (2008) Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator. *Mol Pharmacol*, **73**, 387-398.
- Fernandez, M., Paradisi, M., D'Intino, G., Del Vecchio, G., Sivilia, S., Giardino, L. & Calza, L. (2010) A single prenatal exposure to the endocrine disruptor 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters developmental myelination and remyelination potential in the rat brain. *J Neurochem*, **115**, 897-909.
- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M. & Gonzalez, F.J. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, **268**, 722-726.
- Fernandez-Salguero, P.M., Ward, J.M., Sundberg, J.P. & Gonzalez, F.J. (1997) Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol*, **34**, 605-614.
- Filbrandt, C.R., Wu, Z., Zlokovic, B., Opanashuk, L. & Gasiewicz, T.A. (2004) Presence and functional activity of the aryl hydrocarbon receptor in isolated murine cerebral vascular endothelial cells and astrocytes. *Neurotoxicology*, **25**, 605-616.
- Forster, P.M., Burbank, A.R., Livage, C., Ferey, G. & Cheetham, A.K. (2004) The role of temperature in the synthesis of hybrid inorganic-organic materials: the example of cobalt succinates. *Chem Commun (Camb)*, 368-369.
- Fritz, W.A., Lin, T.M., Safe, S., Moore, R.W. & Peterson, R.E. (2009) The selective aryl hydrocarbon receptor modulator 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran inhibits prostate tumor metastasis in TRAMP mice. *Biochem Pharmacol*, **77**, 1151-1160.
- Fujii-Kuriyama, Y. & Mimura, J. (2003) Transcriptional roles of AhR in expression of biological effects induced by endocrine disruptors. *Pure Appl. Chem.*, **75**, 1819-1826.
- Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S. & Hankinson, O. (1995) Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **270**, 29270-29278.
- Garrison, P.M. & Denison, M.S. (2000) Analysis of the murine AhR gene promoter. *J Biochem Mol Toxicol*, **14**, 1-10.
- Garrison, P.M., Rogers, J.M., Brackney, W.R. & Denison, M.S. (2000) Effects of histone deacetylase inhibitors on the Ah receptor gene promoter. *Arch Biochem Biophys*, **374**, 161-171.
- Gohlke, J.M., Stockton, P.S., Sieber, S., Foley, J. & Portier, C.J. (2009) AhR-mediated gene expression in the developing mouse telencephalon. *Reprod Toxicol*, **28**, 321-328.
- Gouedard, C., Barouki, R. & Morel, Y. (2004) Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, **24**, 5209-5222.
- Graf, W. & Klam, F. (2006) Le système vestibulaire: anatomie fonctionnelle et comparée, évolution et développement. *Evolution*, **5**, 637-655.
- Grehl, H., Grahmann, F., Claus, D. & Neundorfer, B. (1993) Histologic evidence for a toxic polyneuropathy due to exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. *Acta Neurol Scand*, **88**, 354-357.
- Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B. & Bradfield, C.A. (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **40**, 519-561.
- Hahn, M.E. (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact*, **141**, 131-160.
- Hahn, M.E., Allan, L.L. & Sherr, D.H. (2009) Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor. *Biochem Pharmacol*, **77**, 485-497.

- Hahn, M.E., Karchner, S.I., Evans, B.R., Franks, D.G., Merson, R.R. & Lapseritis, J.M. (2006) Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, **305**, 693-706.
- Hahn, M.E., Karchner, S.I., Shapiro, M.A. & Perera, S.A. (1997) Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13743-13748.
- Hankinson, O. (2005) Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*, **433**, 379-386.
- Hankinson, O. (2008) Why does ARNT2 behave differently from ARNT? *Toxicol Sci*, **103**, 1-3.
- Hanneman, W.H., Legare, M.E., Barhoumi, R., Burghardt, R.C., Safe, S. & Tiffany-Castiglioni, E. (1996) Stimulation of calcium uptake in cultured rat hippocampal neurons by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology*, **112**, 19-28.
- Hardingham, G.E. & Bading, H. (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, **11**, 682-696.
- Harper, P.A., Wong, J.Y., Lam, M.S. & Okey, A.B. (2002) Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem Biol Interact*, **141**, 161-187.
- Hays, L.E., Carpenter, C.D. & Petersen, S.L. (2002) Evidence that GABAergic neurons in the preoptic area of the rat brain are targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during development. *Environ Health Perspect*, **110 Suppl 3**, 369-376.
- Hefti, M.H., Francoijs, K.J., de Vries, S.C., Dixon, R. & Vervoort, J. (2004) The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur J Biochem*, **271**, 1198-1208.
- Henklova, P., Vrzal, R., Ulrichova, J. & Dvorak, Z. (2008) Role of mitogen-activated protein kinases in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chem Biol Interact*, **172**, 93-104.
- Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. (1996) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol*, **16**, 1706-1713.
- Hobert, O. & Westphal, H. (2000) Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet*, **16**, 75-83.
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A. & Hankinson, O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, **252**, 954-958.
- Holcomb, M. & Safe, S. (1994) Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumor growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Lett*, **82**, 43-47.
- Huang, M.Y., Chen, C.C., Huber-Reggi, S.P., Neuhauss, S.C. & Straumann, D. (2011) Comparison of infantile nystagmus syndrome in achiasmatic zebrafish and humans. *Ann N Y Acad Sci*, **1233**, 285-291.
- Huang, X., Powell-Coffman, J.A. & Jin, Y. (2004) The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*. *Development*, **131**, 819-828.
- Hufner, K., Stephan, T., Flanagan, V.L., Deutschlander, A., Dera, T., Karch, C., Linn, J., Glasauer, S., Dieterich, M., Strupp, M. & Brandt, T. (2011) Cerebellar and visual gray matter brain volume increases in congenital nystagmus. *Front Neurol*, **2**, 60.
- Hurley, S.L., Brown, D.L. & Cheetham, J.J. (2004) Cytoskeletal interactions of synapsin I in non-neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **317**, 16-23.
- Hushka, L.J., Williams, J.S. & Greenlee, W.F. (1998) Characterization of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran-dependent suppression and AH receptor pathway gene expression in the developing

- mouse mammary gland. *Toxicol Appl Pharmacol*, **152**, 200-210.
- Ikegami, T., Zhang, Y. & Matsuzaki, Y. (2007) Liver fibrosis: possible involvement of EMT. *Cells, tissues, organs*, **185**, 213-221.
- Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y. & Kawajiri, K. (1998) Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **273**, 2895-2904.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y. & Kawajiri, K. (2004a) Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **279**, 19209-19216.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y. & Kawajiri, K. (2004b) Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **317**, 545-550.
- Jacob, A., Hartz, A.M., Potin, S., Coumoul, X., Yousif, S., Scherrmann, J.M., Bauer, B. & Decleves, X. (2011) Aryl hydrocarbon receptor-dependent upregulation of Cyp1b1 by TCDD and diesel exhaust particles in rat brain microvessels. *Fluids Barriers CNS*, **8**, 23.
- Jain, S., Maltepe, E., Lu, M.M., Simon, C. & Bradfield, C.A. (1998) Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev*, **73**, 117-123.
- Jessen, K.R. & Mirsky, R. (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 671-682.
- Takeyama, M., Sone, H. & Tohyama, C. (2001) Changes in expression of NMDA receptor subunit mRNA by perinatal exposure to dioxin. *Neuroreport*, **12**, 4009-4012.
- Takeyama, M. & Tohyama, C. (2003) Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds. *Ind Health*, **41**, 215-230.
- Kalluri, R. & Weinberg, R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, **119**, 1420-1428.
- Karchner, S.I., Franks, D.G. & Hahn, M.E. (2005) AHR1B, a new functional aryl hydrocarbon receptor in zebrafish: tandem arrangement of ahr1b and ahr2 genes. *Biochem J*, **392**, 153-161.
- Karchner, S.I., Franks, D.G., Powell, W.H. & Hahn, M.E. (2002) Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. *J Biol Chem*, **277**, 6949-6959.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L. & Pongratz, I. (2000) The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem*, **275**, 41317-41324.
- Keith, B., Adelman, D.M. & Simon, M.C. (2001) Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6692-6697.
- Kekatpure, V.D., Dannenberg, A.J. & Subbaramaiah, K. (2009) HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. *J Biol Chem*, **284**, 7436-7445.
- Kim, D.S., Forster, P.M., Le Toquin, R. & Cheetham, A.K. (2004) A thermally stable nanoporous nickel 5-sulfoisophthalate; crystal structure and adsorption properties. *Chem Commun (Camb)*, 2148-2149.
- Kim, D.W., Gazourian, L., Quadri, S.A., Romieu-Mourez, R., Sherr, D.H. & Sonenshein, G.E. (2000) The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene*, **19**, 5498-5506.
- Kim, M.D., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (2006) The bHLH-PAS protein Spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of Drosophila dendritic arborization neurons. *Genes Dev*, **20**, 2806-2819.
- Kim, M.J., Marchand, P., Henegar, C., Antignac, J.P., Alili, R., Poitou, C., Bouillot, J.L., Basdevant, A., Le Bizec, B., Barouki, R. & Clement, K. (2011) Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated

- biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. *Environ Health Perspect*, **119**, 377-383.
- Kim, M.J., Pelloux, V., Guyot, E., Tordjman, J., Bui, L.C., Chevallier, A., Forest, C., Benelli, C., Clement, K. & Barouki, R. (2012) Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells. *Environ Health Perspect*, **120**, 508-514.
- Kim, S.Y. & Yang, J.H. (2005) Neurotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells. *Exp Mol Med*, **37**, 58-64.
- Kirschman, L.T., Kolandaivelu, S., Frederick, J.M., Dang, L., Goldberg, A.F., Baehr, W. & Ramamurthy, V. (2010) The Leber congenital amaurosis protein, AIPL1, is needed for the viability and functioning of cone photoreceptor cells. *Hum Mol Genet*, **19**, 1076-1087.
- Ko, H.P., Okino, S.T., Ma, Q. & Whitlock, J.P., Jr. (1997) Transactivation domains facilitate promoter occupancy for the dioxin-inducible CYP1A1 gene in vivo. *Mol Cell Biol*, **17**, 3497-3507.
- Koibuchi, N. (2008) The role of thyroid hormone on cerebellar development. *Cerebellum*, **7**, 530-533.
- Krishnan, V., Porter, W., Santostefano, M., Wang, X. & Safe, S. (1995) Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol Cell Biol*, **15**, 6710-6719.
- Lahvis, G.P. & Bradfield, C.A. (1998) Ahr null alleles: distinctive or different? *Biochem Pharmacol*, **56**, 781-787.
- Lahvis, G.P., Lindell, S.L., Thomas, R.S., McCuskey, R.S., Murphy, C., Glover, E., Bentz, M., Southard, J. & Bradfield, C.A. (2000) Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10442-10447.
- Lahvis, G.P., Pyzalski, R.W., Glover, E., Pitot, H.C., McElwee, M.K. & Bradfield, C.A. (2005) The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse. *Mol Pharmacol*, **67**, 714-720.
- Latchney, S.E., Lioy, D.T., Henry, E.C., Gasiewicz, T.A., Strathmann, F.G., Mayer-Proschel, M. & Opanashuk, L.A. (2011) Neural precursor cell proliferation is disrupted through activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Stem Cells Dev*, **20**, 313-326.
- Lee, A.G. & Brazis, P.W. (2006) Localizing forms of nystagmus: symptoms, diagnosis, and treatment. *Curr Neurol Neurosci Rep*, **6**, 414-420.
- Lees, M.J. & Whitelaw, M.L. (1999) Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol Cell Biol*, **19**, 5811-5822.
- Legare, M.E., Hanneman, W.H., Barhoumi, R. & Tiffany-Castiglioni, E. (1997) The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure in primary rat astroglia: identification of biochemical and cellular targets. *Neurotoxicology*, **18**, 515-524.
- Leigh, R.J. & Khanna, S. (2006) What can acquired nystagmus tell us about congenital forms of nystagmus? *Semin Ophthalmol*, **21**, 83-86.
- Lin, C.H., Chen, C.C., Chou, C.M., Wang, C.Y., Hung, C.C., Chen, J.Y., Chang, H.W., Chen, Y.C., Yeh, G.C. & Lee, Y.H. (2009) Knockdown of the aryl hydrocarbon receptor attenuates excitotoxicity and enhances NMDA-induced BDNF expression in cortical neurons. *J Neurochem*, **111**, 777-789.
- Lin, C.H., Juan, S.H., Wang, C.Y., Sun, Y.Y., Chou, C.M., Chang, S.F., Hu, S.Y., Lee, W.S. & Lee, Y.H. (2008) Neuronal activity enhances aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression and dioxin neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurochem*, **104**, 1415-1429.
- Ma, Q. & Whitlock, J.P., Jr. (1997) A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem*, **272**, 8878-8884.
- Marinkovic, N., Pasalic, D., Ferencak, G., Grskovic, B. & Stavljenic Rukavina,

- A. (2010) Dioxins and human toxicity. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **61**, 445-453.
- Martinez, R., Eller, C., Viana, N.B. & Gomes, F.C. (2011) Thyroid hormone induces cerebellar neuronal migration and Bergmann glia differentiation through epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Neurosci*, **33**, 26-35.
- Marza, E. & Lesa, G.M. (2006) Polyunsaturated fatty acids and neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Soc Trans*, **34**, 77-80.
- Mayati, A., Levoin, N., Paris, H., N'Diaye, M., Courtois, A., Uriac, P., Lagadic-Gossmann, D., Fardel, O. & Le Ferrec, E. (2012) Induction of intracellular calcium concentration by environmental benzo(a)pyrene involves a beta2-adrenergic receptor/adenylyl cyclase/Epac-1/inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in endothelial cells. *J Biol Chem*, **287**, 4041-4052.
- McDougal, A., Gupta, M.S., Morrow, D., Ramamoorthy, K., Lee, J.E. & Safe, S.H. (2001) Methyl-substituted diindolylmethanes as inhibitors of estrogen-induced growth of T47D cells and mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat*, **66**, 147-157.
- McDougal, A., Wilson, C. & Safe, S. (1997) Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumor growth by aryl hydrocarbon receptor agonists. *Cancer Lett*, **120**, 53-63.
- McLean, R.J. & Gottlob, I. (2009) The pharmacological treatment of nystagmus: a review. *Expert Opin Pharmacother*, **10**, 1805-1816.
- McMillan, B.J. & Bradfield, C.A. (2007a) The aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1412-1417.
- McMillan, B.J. & Bradfield, C.A. (2007b) The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Mol Pharmacol*, **72**, 487-498.
- Meyer, B.K. & Perdew, G.H. (1999) Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry*, **38**, 8907-8917.
- Miller, C.L., Llenos, I.C., Cwik, M., Walkup, J. & Weis, S. (2008) Alterations in kynurenine precursor and product levels in schizophrenia and bipolar disorder. *Neurochem Int*, **52**, 1297-1303.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev*, **13**, 20-25.
- Mimura, J. & Fujii-Kuriyama, Y. (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta*, **1619**, 263-268.
- Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M. & Fujii-Kuriyama, Y. (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells*, **2**, 645-654.
- Mulero-Navarro, S., Pozo-Guisado, E., Perez-Mancera, P.A., Alvarez-Barrientos, A., Catalina-Fernandez, I., Hernandez-Nieto, E., Saenz-Santamaria, J., Martinez, N., Rojas, J.M., Sanchez-Garcia, I. & Fernandez-Salguero, P.M. (2005) Immortalized mouse mammary fibroblasts lacking dioxin receptor have impaired tumorigenicity in a subcutaneous mouse xenograft model. *J Biol Chem*, **280**, 28731-28741.
- Narayanan, G.A., Murray, I.A., Krishnegowda, G., Amin, S. & Perdew, G.H. (2012) Selective Aryl Hydrocarbon Receptor Modulator-Mediated Repression of CD55 Expression Induced by Cytokine Exposure. *J Pharmacol Exp Ther*, **342**, 345-355.
- Neuberger, M., Rappe, C., Bergek, S., Cai, H., Hansson, M., Jager, R., Kundi, M., Lim, C.K., Wingfors, H. & Smith, A.G. (1999) Persistent health effects of dioxin contamination in herbicide production. *Environ Res*, **81**, 206-214.
- Nguyen, T.A., Hoivik, D., Lee, J.E. & Safe, S. (1999) Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with

- the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch Biochem Biophys*, **367**, 250-257.
- Nishijo, M., Kuriwaki, J., Hori, E., Tawara, K., Nakagawa, H. & Nishijo, H. (2007) Effects of maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on fetal brain growth and motor and behavioral development in offspring rats. *Toxicol Lett*, **173**, 41-47.
- Nishijo, M., Tawara, K., Nakagawa, H., Honda, R., Kido, T., Nishijo, H. & Saito, S. (2008) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, **18**, 246-251.
- Oesch-Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P., Dietrich, C., Arand, M., Weiss, C., Bockamp, E. & Oesch, F. (2005) Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9218-9223.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y. & Kato, S. (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, **423**, 545-550.
- Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G.J., Miller, C.L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., von Deimling, A., Wick, W. & Platten, M. (2011) An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, **478**, 197-203.
- Petersen, S.L., Curran, M.A., Marconi, S.A., Carpenter, C.D., Lubbers, L.S. & McAbee, M.D. (2000) Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem. *J Comp Neurol*, **427**, 428-439.
- Petrulis, J.R. & Perdew, G.H. (2002) The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact*, **141**, 25-40.
- Pierre, S., Bats, A.S., Chevallier, A., Bui, L.C., Ambolet-Camoit, A., Garlatti, M., Aggerbeck, M., Barouki, R. & Coumoul, X. (2011) Induction of the Ras activator Son of Sevenless 1 by environmental pollutants mediates their effects on cellular proliferation. *Biochem Pharmacol*, **81**, 304-313.
- Pinal, C.S., Cortessis, V. & Tobin, A.J. (1997) Multiple elements regulate GAD65 transcription. *Dev Neurosci*, **19**, 465-475.
- Poland, A., Glover, E. & Kende, A.S. (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem*, **251**, 4936-4946.
- Pollenz, R.S. (2002) The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem Biol Interact*, **141**, 41-61.
- Ponting, C.P. & Aravind, L. (1997) PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol*, **7**, R674-677.
- Porter, F.D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S.S., Wassif, C., Huang, S.P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J.S., Bodine, D., Alt, F. & Westphal, H. (1997) Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development*, **124**, 2935-2944.
- Powell-Coffman, J.A., Bradfield, C.A. & Wood, W.B. (1998) Caenorhabditis elegans orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2844-2849.
- Qin, H. & Powell-Coffman, J.A. (2004) The Caenorhabditis elegans aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev Biol*, **270**, 64-75.
- Quintana, F.J., Basso, A.S., Iglesias, A.H., Korn, T., Farez, M.F., Bettelli, E.,

- Caccamo, M., Oukka, M. & Weiner, H.L. (2008) Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, **453**, 65-71.
- Rannug, A., Rannug, U., Rosenkranz, H.S., Winqvist, L., Westerholm, R., Agurell, E. & Grafstrom, A.K. (1987) Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem*, **262**, 15422-15427.
- Rogan, W.J. & Gladen, B.C. (1992) Neurotoxicology of PCBs and related compounds. *Neurotoxicology*, **13**, 27-35.
- Rowe, R.G., Lin, Y., Shimizu-Hirota, R., Hanada, S., Neilson, E.G., Greenson, J.K. & Weiss, S.J. (2011) Hepatocyte-derived Snail1 propagates liver fibrosis progression. *Mol Cell Biol*, **31**, 2392-2403.
- Rushing, S.R. & Denison, M.S. (2002) The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors can interact with the aryl hydrocarbon (Ah) receptor but fails to repress Ah receptor-dependent gene expression. *Arch Biochem Biophys*, **403**, 189-201.
- Sanchez-Martin, F.J., Fernandez-Salguero, P.M. & Merino, J.M. (2011) Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse. *J Neurochem*, **118**, 153-162.
- Sartor, M.A., Schnekenburger, M., Marlowe, J.L., Reichard, J.F., Wang, Y., Fan, Y., Ma, C., Karyala, S., Halbleib, D., Liu, X., Medvedovic, M. & Puga, A. (2009) Genomewide analysis of aryl hydrocarbon receptor binding targets reveals an extensive array of gene clusters that control morphogenetic and developmental programs. *Environ Health Perspect*, **117**, 1139-1146.
- Sauka-Spengler, T. & Bronner-Fraser, M. (2008) A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 557-568.
- Savouret, J.F., Antenos, M., Quesne, M., Xu, J., Milgrom, E. & Casper, R.F. (2001) 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **276**, 3054-3059.
- Schmidt, J.V. & Bradfield, C.A. (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 55-89.
- Schmidt, J.V., Carver, L.A. & Bradfield, C.A. (1993) Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *J Biol Chem*, **268**, 22203-22209.
- Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C. & Bradfield, C.A. (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6731-6736.
- Schonewille, M., Belmeguenai, A., Koekkoek, S.K., Houtman, S.H., Boele, H.J., van Beugen, B.J., Gao, Z., Badura, A., Ohtsuki, G., Amerika, W.E., Hosy, E., Hoebeek, F.E., Elgersma, Y., Hansel, C. & De Zeeuw, C.I. (2010) Purkinje cell-specific knockout of the protein phosphatase PP2B impairs potentiation and cerebellar motor learning. *Neuron*, **67**, 618-628.
- Schuske, K., Beg, A.A. & Jorgensen, E.M. (2004) The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci*, **27**, 407-414.
- Seo, B.W., Sparks, A.J., Medora, K., Amin, S. & Schantz, S.L. (1999) Learning and memory in rats gestationally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicology and teratology*, **21**, 231-239.
- Shi, L., Fu, A.K. & Ip, N.Y. (2010) Multiple roles of the Rho GEF ephexin1 in synapse remodeling. *Commun Integr Biol*, **3**, 622-624.
- Shin, M., Moghadam, S.H., Sekirnjak, C., Bagnall, M.W., Kolkman, K.E., Jacobs, R., Faulstich, M. & du Lac, S. (2011) Multiple types of cerebellar target neurons and their circuitry in the vestibulo-ocular reflex. *J Neurosci*, **31**, 10776-10786.
- Spink, B.C., Fasco, M.J., Gierthy, J.F. & Spink, D.C. (1998) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate upregulates the Ah receptor and differentially alters CYP1B1 and

- CYP1A1 expression in MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Biochem*, **70**, 289-296.
- Stahl, J.S. (2004) Using eye movements to assess brain function in mice. *Vision Res*, **44**, 3401-3410.
- Takanaga, H., Kunimoto, M., Adachi, T., Tohyama, C. & Aoki, Y. (2001) Inhibitory effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on cAMP-induced differentiation of rat C6 glial cell line. *J Neurosci Res*, **64**, 402-409.
- Tawara, K., Nishijo, M., Honda, R., Maruzeni, S., Seto, T., Kido, T., Saito, S. & Nakagawa, H. (2009) Effects of maternal dioxin exposure on newborn size at birth among Japanese mother-infant pairs. *Environ Health Prev Med*, **14**, 88-95.
- Thiel, R., Koch, E., Ulbrich, B. & Chahoud, I. (1994) Peri- and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: effects on physiological development, reflexes, locomotor activity and learning behaviour in Wistar rats. *Arch Toxicol*, **69**, 79-86.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y. & Nieto, M.A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, **139**, 871-890.
- Thomsen, J.S., Kietz, S., Strom, A. & Gustafsson, J.A. (2004) HES-1, a novel target gene for the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol*, **65**, 165-171.
- Tian, Y., Ke, S., Denison, M.S., Rabson, A.B. & Gallo, M.A. (1999) Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem*, **274**, 510-515.
- Tilikete, C., Pisella, L., Pelisson, D. & Vighetto, A. (2007) [Oscillopsia: pathophysiological mechanisms and treatment]. *Rev Neurol (Paris)*, **163**, 421-439.
- Tomkiewicz, C., Herry, L., Bui, L.C., Metayer, C., Bourdeloux, M., Barouki, R. & Coumoul, X. (2012) The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene*.
- Traber, G.L., Chen, C.C., Huang, Y.Y., Spoor, M., Roos, J., Frens, M.A., Straumann, D. & Grimm, C. (2012) Albino mice as an animal model for infantile nystagmus syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **53**, 5737-5747.
- Unkila, M., Tuomisto, J.T., Pohjanvirta, R., MacDonald, E., Tuomisto, L., Koulu, M. & Tuomisto, J. (1993) Effect of a single lethal dose of TCDD on the levels of monoamines, their metabolites and tryptophan in discrete brain nuclei and peripheral tissues of Long-Evans rats. *Pharmacol Toxicol*, **72**, 279-285.
- van der Spuy, J. & Cheetham, M.E. (2004) Role of AIP and its homologue the blindness-associated protein AIPL1 in regulating client protein nuclear translocation. *Biochem Soc Trans*, **32**, 643-645.
- Vanhoutte, P. & Bading, H. (2003) Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Curr Opin Neurobiol*, **13**, 366-371.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.C. & Stockinger, B. (2008) The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, **453**, 106-109.
- Vogel, C.F., Sciallo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G. & Matsumura, F. (2007) RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol*, **21**, 2941-2955.
- Walisser, J.A., Glover, E., Pande, K., Liss, A.L. & Bradfield, C.A. (2005) Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17858-17863.
- Wei, Y.D., Helleberg, H., Rannug, U. & Rannug, A. (1998) Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem Biol Interact*, **110**, 39-55.
- Wernet, M.F., Mazzoni, E.O., Celik, A., Duncan, D.M., Duncan, I. & Desplan, C. (2006) Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic

- for colour vision. *Nature*, **440**, 174-180.
- White, L.D. & Barone, S., Jr. (2001) Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. *Cell Death Differ*, **8**, 345-356.
- Willey, J.J., Stripp, B.R., Baggs, R.B. & Gasiewicz, T.A. (1998) Aryl hydrocarbon receptor activation in genital tubercle, palate, and other embryonic tissues in 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive lacZ mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **151**, 33-44.
- Williamson, M.A., Gasiewicz, T.A. & Opanashuk, L.A. (2005) Aryl hydrocarbon receptor expression and activity in cerebellar granule neuroblasts: implications for development and dioxin neurotoxicity. *Toxicol Sci*, **83**, 340-348.
- Wincent, E., Amini, N., Luecke, S., Glatt, H., Bergman, J., Crescenzi, C., Rannug, A. & Rannug, U. (2009) The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem*, **284**, 2690-2696.
- Xing, X., Bi, H., Chang, A.K., Zang, M.X., Wang, M., Ao, X., Li, S., Pan, H., Guo, Q. & Wu, H. (2012) SUMOylation of AhR modulates its activity and stability through inhibiting its ubiquitination. *J Cell Physiol*, **227**, 3812-3819.
- Yan, N., Zhao, Y., Wang, Y., Xie, A., Huang, H., Yu, W., Liu, X. & Cai, S.P. (2011) Molecular genetics of familial nystagmus complicated with cataract and iris anomalies. *Mol Vis*, **17**, 2612-2617.
- Zaher, H., Fernandez-Salguero, P.M., Letterio, J., Sheikh, M.S., Fornace, A.J., Jr., Roberts, A.B. & Gonzalez, F.J. (1998) The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Mol Pharmacol*, **54**, 313-321.
- Zhang, S., Lei, P., Liu, X., Li, X., Walker, K., Kotha, L., Rowlands, C. & Safe, S. (2009) The aryl hydrocarbon receptor as a target for estrogen receptor-negative breast cancer chemotherapy. *Endocr Relat Cancer*, **16**, 835-844.
- Zhao, D., Pritts, E.A., Chao, V.A., Savouret, J.F. & Taylor, R.N. (2002) Dioxin stimulates RANTES expression in an in-vitro model of endometriosis. *Mol Hum Reprod*, **8**, 849-854.

Etude du rôle du AhR dans le système nerveux des souris C57BL/6J.

Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) est un facteur de transcription de la famille bHLH/PAS, activé par différents ligands exogènes dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou halogénés (dioxines). A ce titre, il est décrit historiquement comme un récepteur de xénobiotiques dont le principal rôle est l'élimination de ces composés *via* la régulation des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Toutefois, des études récentes menées à l'aide de modèles souris invalidées pour le AhR, suggèrent indirectement que cette protéine régule des fonctions endogènes, notamment dans le système nerveux de mammifères dans lequel aucun rôle du AhR n'a jusqu'à présent été démontré. Nous avons donc utilisé le modèle de souris C57BL/6J AhR^{-/-} pour mener à la fois des études comportementales et mécanistiques afin de déterminer ce rôle.

Tout d'abord, nous avons identifié un défaut oculomoteur chez les souris AhR^{-/-}, caractérisé par des mouvements spontanés horizontaux. En étudiant l'ensemble des circuits neurosensoriels potentiellement impliqués dans ce nystagmus pendulaire, nous avons montré que son origine est liée à des déficits du système visuo-moteur. De plus, en caractérisant et comparant les profils d'expression génique des cervelets de souris AhR^{+/+} et AhR^{-/-} traitées ou non par de la 2,3,7,8 TétrachloroDibenzo-*p*-Dioxine (TCDD), nous avons montré que ce polluant, ligand du AhR, perturbait les fonctions endogènes du récepteur. Cet effet de « perturbation endogène » a été retrouvé dans un autre organe et est associé à une toxicité (fibrose hépatique).

Cette étude a permis d'identifier de nouvelles fonctions physiologiques du AhR dans le système nerveux des souris, de caractériser un nouveau modèle animal de nystagmus pendulaire et ouvre de nouvelles perspectives de travail en neurotoxicologie.

Investigation of the role of the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) in the nervous system of C57BL/6J mice

The AhR is a basic helix-loop-helix Per/ARNT/Sim family (bHLH-PAS) transcription factor which is activated by many diverse compounds including polyphenols and aromatic hydrocarbons such as 2,3,7,8 TétrachloroDibenzo-*p*-Dioxin (TCDD). Initially, the AhR was described as a ubiquitous xenobiotic-activated transcription factor which promotes the elimination of xenobiotics by regulating the expression of genes involved in xenobiotic metabolism. However, mouse AhR knockout models have demonstrated that the AhR also regulates other normal physiological functions. In particular, functioning of the nervous system of mammals, previously unexplored in this respect, might depend upon the activity of the AhR. We, thus, performed behavioral and gene expression studies in AhR^{-/-} mice to discover these functions.

We, first, found that AhR^{-/-} mice exhibit an oculomotor deficit which is characterized by spontaneous horizontal pendular eye movements that are probably due to a deficit in the visuo-motor circuitry. Second, we found that the cerebellar gene expression profiles of AhR^{-/-} as compared to AhR^{+/+} mice resembled those of AhR^{+/+} mice treated with TCDD (the ligand with the highest affinity for the AhR). This suggests that TCDD disrupts some normal physiological functions of the AhR in the nervous system. Third, AhR^{-/-} mice and AhR^{+/+} treated with TCDD both develop liver fibrosis. This further suggests a role for the AhR in normal liver function.

In conclusion, this study reveals new physiological functions for the AhR in the mouse nervous system and describes a new model of pendular nystagmus. Moreover, the results also provide novel research perspectives in the field of neurotoxicology.